



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA, PEDIATRÍA Y RADIOLOGÍA

**“INMUNOLOCALIZACIÓN DE LA SUSTANCIA P
Y DEL RECEPTOR NK1 EN LA MOLA
HIDATIDIFORME HUMANA”**

TESIS DOCTORAL

Ana Isabel Garrido Ocaña

Sevilla, 2015

DR. D. DON MIGUEL MUÑOZ SÁEZ, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA POR LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA,

CERTIFICA:

Que, bajo su dirección, la licenciada en Medicina y Cirugía doña Ana Isabel Garrido Ocaña ha realizado el trabajo titulado **“INMUNOLOCALIZACIÓN DE LA SUSTANCIA P Y DEL RECEPTOR NK1 EN LA MOLA HIDATIDIFORME HUMANA”**.

El trabajo reúne, en su criterio, todas las características exigibles desde el punto de vista legal y científico para que con su defensa pueda alcanzar el título de Doctora por la Universidad de Sevilla.

Sevilla, 1 de septiembre de 2015

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'M. Muñoz Sáez', written over a faint, circular official stamp.

Fdo. Dr. D. Miguel Muñoz Sáez

DR. D. JUAN CARLOS CRESPO DE LA ROSA, PROFESOR ASOCIADO DEL DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA, PEDIATRIA Y RADIOLOGÍA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA,

CERTIFICA:

Que, bajo su tutorización, la licenciada en Medicina y Cirugía doña Ana Isabel Garrido Ocaña ha realizado el trabajo titulado **“INMUNOLOCALIZACIÓN DE LA SUSTANCIA P Y DEL RECEPTOR NK1 EN LA MOLA HIDATIDIFORME HUMANA”**.

El trabajo reúne todas las características exigibles desde el punto legal y científico para que con su defensa pueda alcanzar el título de Doctora por la Universidad de Sevilla.

Sevilla, 1 de septiembre de 2015

A handwritten signature in dark ink, consisting of a long horizontal stroke followed by a series of loops and vertical strokes.

Fdo. Dr. D. Juan Carlos Crespo de la Rosa

**DÑA. ANA ISABEL GARRIDO OCAÑA, LICENCIADA EN MEDICINA POR LA FACULTAD DE
MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA,**

CERTIFICA:

**Que es la autora del trabajo titulado “INMUNOLOCALIZACIÓN DE LA SUSTANCIA P
Y DEL RECEPTOR NK1 EN LA MOLA HIDATIDIFORME HUMANA”.**

Este trabajo ha sido dirigido por D. Miguel Muñoz Sáez, doctor en Medicina y Cirugía, y tutorizado por D. Juan Carlos Crespo de la Rosa, profesor asociado del Departamento de Farmacología, Pediatría y Radiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla.

Y para que así conste, firmo la presente certificación.

Sevilla, 1 de septiembre de 2015



Fdo. Dr. Dña. Ana Isabel Garrido Ocaña

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Miguel Muñoz, sin quien este trabajo no hubiera sido posible. Gracias por haberme ofrecido sus ideas y los medios, su entusiasmo en compartir su conocimiento, su generosidad, su disponibilidad siempre. Gracias por la confianza que ha depositado en mí y por querer ser mi maestro, sin solicitar a cambio nada más que el afán de aprender y el compromiso de devolver a los demás lo que yo he recibido.

A la Dra. Rosso, por enseñarme a no darme por vencida ante los desafíos intelectuales y personales y por su entusiasmo contagioso.

A la Dra. Vieites, por ayudarme a aprender tantas cosas en tan poco tiempo, transmitiéndome además la importancia de la rigurosidad y dedicación a su trabajo.

A mi amiga la Dra. María García por su ayuda generosa, sus consejos y sus enseñanzas, y al Dr. Panizo por sus aportaciones desinteresada en la distancia.

A mis amigos Kety, Victoria, Elvira, Eva, María y José Carlos, por compartir conmigo la vida en todos los momentos, incondicional y pacientemente, incluyendo mis ausencias por este trabajo. A mis amigas Gema e Inmaculada por su apoyo diario.

A mis padres, por su cariño infinito, y porque ellos me han enseñado siempre el valor de la fuerza de voluntad y que el esfuerzo merece la pena siempre, aunque la recompensa no sea inmediata. Gracias a ellos he podido llegar hasta aquí.

A Luis, por su cuidado y cariño continuo, y por decidir acompañarme en este trabajo, igual que decidió acompañarme en la vida.

ABREVIATURAS

μm	Micra o micrómetro
μM	Micromolar
AA	Ácido araquidónico
AC	Adenilato ciclasa
ACE	Enzima convertidora de angiotensina
ACTH	Hormona adrenocorticotropa
ADAM	A disintegrina y metaloproteinasa
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
AP-1	Proteína activadora 1
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosín trifosfato
Bcl-2 protooncogen	Del inglés <i>B-cell lymphoma 2 protooncogene</i>
C14TKL-1	Péptido-1 similar a las TK del cromosoma 14
Ca^{++}	Ión Calcio
CCK	Colecistocinina
CLR	Receptor calcitonina-like
cm	Centímetro
CREB	Elementos de respuesta a AMPc
CRH	Hormona liberadora de corticotropina
DAG	Diacylglicerol
DP-IV	Dipeptidil aminopeptidasa IV
EC-1	Enzima de conversión de endotelina 1
ECL	Asa extracelular
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor de factor de crecimiento epidérmico
EKA	Endoquinina A
EKB	Endoquinina B
EKC	Endoquinina C
EKD	Endoquinina D
ERK1/2	Del inglés <i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
ETG	Enfermedad trofoblástica gestacional
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
FIGO	Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia.

FISH	Hibridación in situ por fluorescencia
FSH	Hormona estimulante de folículo
GABA	Ácido γ-amino butírico
GH	Hormona de crecimiento
GHRH	Hormona liberadora de la hormona de crecimiento
GM-CSF	Factor estimulante de colonia de granulocitos macrófagos
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropina
GPCR	Receptores acoplados a proteína G
GRKs	Quinasa de receptores acoplados a proteína G
GTP	Guanosín trifosfato
GTPasa	Actividad de hidrólisis de GTP
hCG	Gonadotrofina coriónica
HIF-α	Factor inducible por la hipoxia 1-α
HK-1	Hemoquinina 1
hPL	Lactógeno placentario
IGFS	Factores de crecimiento insulínicos
IL	Interleukina
IP₃	Inositol trifosfato
ISSTD	International Society for the Study of Trophoblastic Diseases
JDP	Proteína de dimerización Jun
L	Litro
Leu-Enk	Leuencefalina
LH	Hormona luteinizante
LIF	Factor inhibidor de leucemia
LX	Leucotrienos
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
M-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos
MDM2 oncogene	Del inglés <i>Murine double mini 2 oncogene</i>
MEKK	MAP quinasa quinasa
Met-Enk	Metencefalina
mL	Mililitro
MLC	Cadena ligera reguladora de la miosina
MMPs	Metaloproteinasas de la matriz
mUI	Miliunidades internacionales
NE	Endopeptidasa neutra
NF-KB	Factor nuclear -KB
NKA	Neuroquinina A
NKB	Neuroquinina B
nM	Nanomolar

NO	Óxido nítrico
NP	Neuropéptido
NPy	Neuropéptido γ
NPK	Neuropéptido K
NTG	Neoplasia trofoblástica gestacional
Nur77	Factor de crecimiento neural I B
OMS	Organización mundial de la salud
PARP	Polimerasas implicadas en la reparación de ADN
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
PEP	Endopeptidasa post prolina
PKA	Proteínquinasa A
PKB/Akt	Proteínquinasa B
PKC	Proteínquinasa C
PKC-δ	Proteínquinasa C- δ
PLC-β	Fosfolipasa C- β
pM	Picomolar
PP2A	Proteína fosfatasa 2A
PRGC	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
Pyk2	Proteína tirosina quinasa 2
Rab	Proteína relacionada con Ras
RB	Proteína de retinoblastoma
RE	Retículo endoplásmico
RMN	Resonancia magnética nuclear
RNK1	Receptor de neuroquinina 1
RNK1-fl	Del inglés RNK1 <i>full lenght</i>
RNK1-tr	Del inglés RNK1 <i>truncated</i>
RNK2	Receptor de neuroquinina 2
RNK3	Receptor de neuroquinina 3
ROCKs	Proteínquinasa asociada a Rho
RTK	Receptor de taquicinina
sFlt-1	Del inglés <i>Soluble Fms-like tyrosine kinase-1</i>
SNC	Sistema nervioso central
SP	Sustancia P
SPDE	Encima degradante de la sustancia P
SS	Somatostatina
STR	Del inglés <i>Short tandem repeat</i>
TC	Tomografía computerizada
TG-α	Factor de crecimiento transformante α
TG-β	Factor de crecimiento transformante β
TIAR	Proteínas ligadoras de ARN

TIMPs	Inhibidores de las metaloproteinasas
TK	Taquicininas
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
TRH	Hormona liberadora de tirotropina
TTSP	Tumor trofoblástico del sitio placentario
TXA₂	Tromboxano A ₂
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
VIP	Péptido intestinal vasoactivo
WAP	Del inglés <i>Whey acidic protein</i>

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. LA MOLA HIDATIDIFORME HUMANA	3
1.1. Concepto y antecedentes históricos de la mola hidatidiforme	3
1.2. Embriología e histología del desarrollo placentario	7
1.2.1. Período prevellositario	8
1.2.2. Desarrollo vellositario	11
1.2.3. Nutrición histotrófica y hemotrófica	14
1.2.4. Regresión vellositaria y formación de la placenta definitiva	15
1.2.5. Estructura básica del árbol vellositario	16
1.2.6. Arquitectura del árbol vellositario	17
1.2.7. Angioarquitectura de las vellosidades	22
1.3. Epidemiología de la mola hidatidiforme	23
1.4. Etiología y genética de la mola hidatidiforme	24
1.5. Embriología e histología de la mola hidatidiforme	25
1.5.1. Características de la mola completa	26
1.5.2. Características de la mola parcial	30
1.6. Clasificación de enfermedad trofoblástica gestacional	33
1.7. Presentación clínica	34
1.8. Diagnóstico de la mola hidatidiforme	36
1.8.1. Examen ecográfico	36
1.8.2. Determinación de hCG	37
1.8.3. Inmunohistoquímica	38
1.8.4. Genotipo molecular	40
1.9. Tratamiento y seguimiento de la mola hidatidiforme	41
1.9.1. Tratamiento	41
1.9.2. Seguimiento	42
1.10. Neoplasia trofoblástica gestacional (NTG)	44
1.10.1. Diagnóstico, clasificación y estadiaje	44
1.10.2. Clasificación pronóstica	46
1.10.3. Tratamiento	47

2. LA SUSTANCIA P Y EL RECEPTOR NK1	48
2.1. Neuronas y neurotransmisores	48
2.2. Neuropéptidos (NP)	54
2.2.1. Biosíntesis de los NP	54
2.2.2. Sinapsis peptidérgicas	55
2.2.3. Receptores de los NP	58
2.2.4. Clasificación de los NP	60
2.3. Taquicinas (TK)	62
2.3.1. Estructura y genes de las TK de mamíferos	64
2.3.2. Acciones de las TK	66
2.4. Receptores taquicinérgicos (RTK)	69
2.4.1. Clasificación, estructura y genes de los RTK	69
2.5. Sustancia P (SP)	70
2.6. Receptores NK1 (RNK1)	72
2.6.1. Estructura de RNK1	72
2.6.2. Isoformas y subtipos de RNK1	76
2.7. Vías de señalización intracelular de RNK1	79
2.8. Acciones fisiológicas de la SP y RNK1	85
2.9. Fisiopatología relacionada con la SP y RNK1	86
2.10. Antagonistas de RNK1	88
2.10.1. Antagonistas peptídicos	89
2.10.2. Antagonistas no peptídicos	90
 II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	 93

III. MATERIAL Y MÉTODO	97
1. MÉTODO DE TRABAJO	99
1.1. Diseño del estudio	99
1.2. Población de estudio y tamaño muestral	99
1.3. Aspectos éticos	100
2. MATERIAL DE ESTUDIO Y TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA	101
2.1. Material biológico: anticuerpos y mola hidatidiforme	101
2.2. Procesamiento de muestras e inmunohistoquímica	102
2.3. Valoración e interpretación de los resultados	105
IV. RESULTADOS	107
1. DESCRIPCIÓN DE LA SERIE DE CASOS	109
2. TINCIÓN CON HEMATOXILINA-EOSINA	113
3. EXPRESIÓN Y DISTRIBUCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA SP	116
4. EXPRESIÓN Y DISTRIBUCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DEL RNK1	125
5. CONTROL NEGATIVO	133
6. RESUMEN DE LOS RESULTADOS	134
V. DISCUSIÓN	137
VI. RESUMEN	173
VII. CONCLUSIONES	177
VIII. ANEXOS	181
IX. BIBLIOGRAFÍA	191

FIGURAS, TABLAS Y GRÁFICOS

FIGURAS

Figura 1. Ilustración de embarazo molar de Paul Portal.

Figura 2. Microfotografía de un embrión en estadio 4 de Carnegie.

Figura 3.

A. Representación esquemática de blastocito humano de 7 días y medio en fase prelacunar.

B. Microfotografía de un embrión en estadio 5a de Carnegie.

Figura 4.

A. Representación esquemática de blastocito humano de 9 días.

B. Microfotografía de un embrión humano en estadio 5b de Carnegie.

Figura 5.

A. Representación esquemática de blastocito humano de 13 días.

B. Microfotografías de embrión en estadio 6 de Carnegie.

Figura 6. Representación esquemática del desarrollo de una vellosidad.

A. Sección transversal de una vellosidad primaria.

B. Sección transversal de una vellosidad secundaria.

C. Mesoderma de la vellosidad terciaria.

D. Sección longitudinal a través de vellosidad al final de la tercera semana del desarrollo.

Figura 7.

A. Representación esquemática de embrión y trofoblasto al final de la tercera semana.

B. Microfotografía de embrión en estadio de Carnegie 7.

Figura 8. Placenta humana madura.

Figura 9.

A. Sección longitudinal de una vellosidad mesenquimal.

B. Vellosidad mesenquimal en la semana 6 con una red vascular de cordones hemangiogénicos.

Figura 10. Corte semifino de una vellosidad intermedia inmadura.

Figura 11. Corte semifino de un tronco vellositario.

Figura 12. Corte semifino de vascularización de vellosidad intermedia madura y vellosidad terminal.

Figura 13. Microscopía electrónica de vellosidad terminal.

Figura 14. Esquema de la disposición de los vasos fetales en un grupo de vellosidades terminales.

Figura 15 . Origen genético de las gestaciones molares.

Figura 16. Aspecto macroscópico de la mola hidatidiforme completa

Figura 17. Mola hidatidiforme completa del segundo trimestre.

Figura 18. Microfotografía de una mola completa del primer trimestre

Figura 19. Microfotografías de mola hidatidiforme completa precoz de primer trimestre.

Figura 20. Aspecto macroscópico de mola hidatidiforme parcial.

Figura 21. Mola parcial del segundo trimestre.

Figura 22. Características histomorfológicas de una mola parcial en la semana 10.

Figura 23. Examen ecográfico de gestación molar completa del primer trimestre

Figura 24. Secciones tisulares representativas sometidas a tinción de inmunohistoquímica para proteína p57.

Figura 25. Dibujos realizados por Cajal de diferentes estructuras del SNC.

Figura 26. Sinapsis en una neurona motora típica.

Figura 27. Representación esquemática de una sinapsis eléctrica.

Figura 28. Representación esquemática de una sinapsis química.

Figura 29. Representación esquemática de la síntesis y liberación de NP y neurotransmisores.

Figura 30.

A. Estructura de receptor acoplado a proteína G.

B. Estructura de proteína G

Figura 31.

A. Activación de proteína G.

B. Inactivación de proteína G.

Figura 32. Vías efectoras de los receptores acoplados a proteína G.

Figura 33. Estructura de los genes TAC humanos y la existencia de isoformas de ARNm.

Figura 34. Representación esquemática de la contribución de las TK y los receptores de neuroquininas al dolor y la inflamación neurogénica.

Figura 35. Representación esquemática de la estructura del receptor NK1 humano.

Figura 36.

A. Imagen que muestra la visión extracelular del RNK1 y residuos que interactúan con SP.

B. Sitios de unión del antagonista no peptídico CP-96,345.

C. Modelo estructural del RNK1 con la distintas conformaciones de SP

Figura 37. Representación esquemática de las diferencias estructurales y funcionales de las isoformas de RNK1.

Figura 38. Representación esquemática de la selectividad de los subtipos de RNK1.

Figura 39. Mecanismos de señalización del RNK1.

Figura 40. Señalización del receptor NK1 mediante señalosomas.

Figura 41. Regulación de señalización de receptor NK1.

Figura 42. Representación tridimensional de la estructura química de antagonistas no peptídicos de RNK1.

Figura 43. Microfotografías de placenta del primer trimestre.

Figura 44. Microfotografías de mola hidatidiforme completa.

Figura 45. Microfotografías de mola hidatidiforme parcial.

Figura 46. Inmunoreactividad a SP en mola hidatidiforme completa en sicitiotrofoblasto.

Figura 47. Expresión inmunohistoquímica de SP en sincitiotrofoblasto de mola completa.

Figura 48. Expresión inmunohistoquímica de SP en brote sincitial en mola completa.

Figura 49. Expresión inmunohistoquímica de SP en citotrofoblasto y estroma vellositario.

Figura 50. Inmunorreactividad a SP en fibroblastos.

Figura 51. Expresión de SP en fibroblastos estromales y macrófagos.

Figura 52. Inmunoreactividad a SP en trofoblasto intermedio.

Figura 53. Inmunoreactividad a SP en decidua.

Figura 54. Inmunoreactividad a RNK1 en sincitiotrofoblasto de la mola hidatidiforme completa

Figura 55. Expresión de RNK1 en citotrofoblasto y células estromales en mola completa.

Figura 56. Inmunoreactividad citoplasmática a RNK1 en fibroblastos en mola completa.

Figura 57. Inmunorreactividad a RNK1 en macrófagos en mola parcial.

Figura 58. Inmunorreactividad a RNK1 en trofoblasto intermedio.

Figura 59. Expresión de RNK1 a nivel de la decidua.

Figura 60. Imágenes de control negativo.

TABLAS

Tabla 1. Clasificación de enfermedad trofoblástica gestacional de la OMS.

Tabla 2. Estadaje clínico de la FIGO de la neoplasia trofoblástica gestacional.

Tabla 3. Puntuación pronóstica FIGO 2000 de la neoplasia trofoblástica gestacional.

Tabla 4. Clasificación de los neurotransmisores.

Tabla 5. Clasificación de los principales péptidos en mamíferos.

Tabla 6. Secuencia de los diferentes NP que integran la familia de las taquicinas de mamíferos.

Tabla 7. Valoración de expresión nuclear de SP en la tinción inmunohistoquímica.

Tabla 8. Puntuación Allred para valoración de expresión nuclear de SP en sincitiotrofoblasto.

Tabla 9. Puntuación Allred para valoración de expresión nuclear de SP en citiotrofoblasto.

Tabla 10. Puntuación Allred para valoración de expresión nuclear de SP en fibroblastos.

Tabla 11. Puntuación Allred para valoración de expresión nuclear de SP en macrófagos.

Tabla 12. Puntuación Allred para valoración de expresión nuclear de SP en trofoblasto intermedio

Tabla 13. Puntuación Allred para valoración de expresión nuclear de SP en células deciduales

Tabla 14. Valoración de expresión citoplasmática de RNK1 en la tinción inmunohistoquímica.

Tabla 15. Puntuación Allred para valoración de expresión citoplasmática de RNK1 en el sincitiotrofoblasto.

Tabla 16. Puntuación Allred para valoración de expresión citoplasmática de RNK1 en el citotrofoblasto

Tabla 17. Puntuación Allred para valoración de expresión citoplasmática de RNK1 en el fibroblastos.

Tabla 18. Puntuación Allred para valoración de expresión citoplasmática de RNK1 en el macrófagos.

Tabla 19. Puntuación Allred para valoración de expresión citoplasmática de RNK1 en el trofoblasto intermedio.

Tabla 20. Puntuación Allred para valoración de expresión citoplasmática de RNK1 en el células deciduales.

GRÁFICOS

Gráfico 1. Evolución de los niveles de hCG en paciente con criterios de ETG persistente.

Gráfico 2. Ejemplo de paciente con evolución de los niveles de hCG en mola sin evolución a ETG persistente.

I. INTRODUCCIÓN

1. LA MOLA HIDATIDIFORME HUMANA

1.1. Concepto y antecedentes históricos de la mola hidatidiforme

La mola hidatidiforme humana es una alteración de la gestación, encuadrada en el momento actual, conceptualmente como una de las cuatro entidades clinicopatológicas que constituyen la enfermedad trofoblástica gestacional (ETG).

La enfermedad trofoblástica gestacional comprende un espectro de procesos malignos y benignos poco frecuentes, derivados de una proliferación anormal de la placenta humana (hiperplasia) y del genoma paterno, con una contribución materna ocasional. Incluye los trastornos del desarrollo placentario como alteración de la fertilización (mola hidatidiforme completa, mola parcial y la mola invasiva), coriocarcinoma, el tumor trofoblástico del sitio placentario (TTSP) y lesiones derivadas del trofoblasto coriónico.

Etimológicamente la palabra mola proviene del latín (masa o montaña de forma redonda o maciza), y a su vez ésta del griego **mýlē** (myle). Esta palabra se documentó en España desde 1493. La palabra mola, asumió una de las acepciones del griego, que es la de embrión abortado, embrión inviable.

El conocimiento de la mola hidatidiforme se remonta a Hipócrates (siglo V a.C), Aristóteles (siglo IV a.C), y Galeno (siglo II), que entendieron por tal, los óvulos abortivos degenerados, con aspecto de masa informe. Hipócrates describió la mola hidatidiforme como una hidropesía o retención de líquido en el útero.

Es difícil atribuir la autoría de la primera **descripción** de una mola hidatidiforme de las múltiples que se han sucedido a lo largo de la historia, siendo lo más probable que se correspondiera con las realizadas por Diocles de Corinto (siglo III a.C.), dentro de la escuela hipocrática o Aetius de Amida (siglo VI), que describió el útero lleno de vejigas (Guijarro, 1997).

En nuestro país, López de Villalobos y Cristóbal de la Vega, ofrecen las primeras descripciones compatibles con molas hidatidiformes a finales del siglo XV y hasta mediados del siglo XVI (De la Vega, 1564; López de Villalobos, 1498).

Una de las primeras ilustraciones de la enfermedad, puede ser encontrada en el libro “La pratique des accouchemens soutenue d’un grand nombre d’observations” en el año 1685. En este libro Paul Portal (médico francés del siglo XVI, que fue el primero en describir adecuadamente la placenta previa), puntualiza en la leyenda de la ilustración,

que se trata de una figura de una mala concepción en forma de uvas de Corinto, que se parece a un desove de ranas (Figura 1).

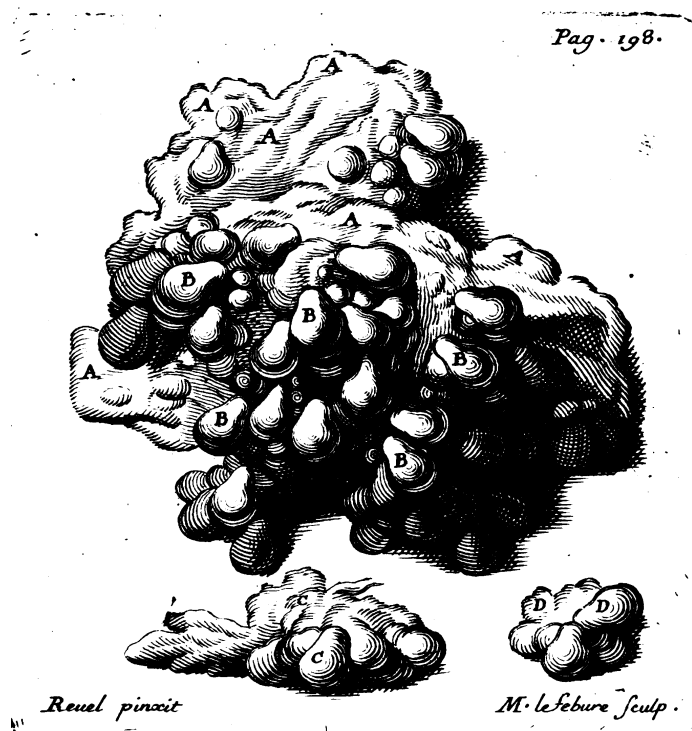


Figura 1. Embarazo molar. La pratique des accouchemens soutenue d'un grand nombre d'observations. (Imagen tomada de Portal, 1685).

El obstetra William Smelli (1697-1763) es el primero que correlaciona los conceptos mola e hidátide, apunta la aparición de un cáncer uterino posterior a la sintomatología de la mola y describe un caso en el que coexistió un feto vivo con una gestación molar (Smelli, 1764).

Al margen de las teorías médicas de cada época, todos los casos de mola, falsa preñez o "preñez de trasgo" supusieron un quebranto social en cuanto a la identificación de su causa. Por ello, tanto o más que en los textos médicos, encontramos descripciones de posibles molas hidatidiformes en la literatura, especialmente durante el barroco español, con todos los aditamentos fantásticos de este tipo de obras. Antonio Torquemada en su *Jardín de flores curiosas* (1570), refiere el parto de Margarita, condesa de Irlanda, en el que nacieron 366 hijos pequeños como ratones, que fueron bautizados por un obispo en una bandeja (Suárez Figaredo, 2012).

Pero, no sólo han sido interesantes desde el punto de visto histórico los avances en el desarrollo del concepto y de la descripción de la enfermedad, sino también la evolución

del conocimiento de la **etiopatogenia** desde las teorías reproductivas en la época clásica hasta nuestros días con la genética y la biología molecular, que han permitido caracterizar las enfermedades que constituyen hoy la ETG.

Hasta el siglo XIX, la explicación ecológica del desarrollo de una mola vino marcada por las explicaciones galénicas del proceso fecundativo, cuyas bases teóricas se remontan a las doctrinas de los filósofos presocráticos como Parménides (García, 2009). La teoría de la escuela hipocrática (siglo V-IV a.C.) otorgaba a la mujer la capacidad para emitir semen, equiparando su papel al del hombre (García, 2009), de modo que en el tratado Sobre la Dieta, Hipócrates considera que “lo que se desarrolla no es sólo el germen segregado por el hombre, sino también el de la mujer” (Hipócrates, 1997).

Durante toda la Edad Media (siglo V-XV), la persistencia del galenismo mantendrá la idea de que, si bien el embrión se origina de la "mixtión" de ambos humores, masculino y femenino, es el primero el que, como elemento activo, imprime la forma a la sangre menstrual, que constituye la parte material del proceso. Se atribuyó la causa de la mola a la falta de la semilla masculina o a un vicio de ésta que impidiese ejercer su función (Guijarro, 1997).

Desde finales del siglo XVIII hasta avanzado el XIX se consideró a la mola como un verdadero vermes quístico, siendo Alfred Velpeau y Marie-Anne Victoire Gillain Boivin, en la primera mitad del siglo XIX, los primeros que combatieron la idea de que estas vesículas fueran verdaderos quistes y tuvieran alguna relación con cualquier tipo de gusanos (Guijarro, 1997).

Los **tratamientos** especificados para hacer salir una mola de la matriz eran sangrías, purgantes violentos y emenagogos, recurriendo sólo si esto era infructuoso, a la operación manual (Ballano, 1815).

En el año 1827, la doctora Boivin y el doctor Velpeau, de forma independiente, publicaron que la enfermedad dependía de un cambio en las vellosidades coriales. Madam Boivin fue uno de los primeros médicos en reconocer el origen coriónico de la mola hidatidiforme, de modo que sus descripciones realizadas en su libro “Nouvelles recherches sur l'origine, la nature et le traitement de la môle vésiculaire”, son referenciadas en los boletines médicos de la época (Société de Médecins, 1827).

Precisamente a principios del siglo XIX, se inicia el desarrollo de la **mentalidad anatomoclínica** siendo su principal exponente Bichat (1711-1802) con su obra Anatomía

general. Con posterioridad, la mentalidad anatomoclínica microscópica fue establecida tras la Teoría celular de Schwann en 1837: la célula es la unidad estructural y funcional de todos los seres vivos, con capacidad para mantener de manera independiente el estado vital.

Hasta este momento, se habían establecido **clasificaciones** de la mola fundamentadas en el aspecto morfológico de éstas: molas duras o carnosas, molas huecas o vesiculares y molas embrionarias (Defermon, 1827; Guijarro, 1997).

La nosología anatomoclínica separa definitivamente las molas falsas de las molas verdaderas, entendiendo como mola verdadera, vesicular o hidatiforme al desarrollo vesicular anómalo de las vellosidades coriales como consecuencia de un desarrollo anormal del producto de la concepción. (Guijarro, 1997).

El desarrollo de esta mentalidad anatomoclínica durante el siglo XIX conducirá al establecimiento de la etiología de la mola. Virchow en el año 1853, establece la etiología de la mola y concluye que se trata de un mixoma de las vellosidades coriales (Bland-Sutton, 1911).

El conocimiento de la ETG y del coriocarcinoma, avanza con Max Sanger en el año 1889. Sanger proporciona la descripción de dos casos de abortos espontáneos y los correlaciona con hemorragia tras el aborto, tos y disnea con el hallazgo macroscópico en la necropsia de un tumor esponjoso uterino con la apariencia de un sarcoma teleangiectásico y el hallazgo microscópico de células multinucleadas no epiteliales. Acuñó el término deciduoma maligno, considerando que las células de la decidua eran el origen del tumor (Marcus, 2011) .

Marchand en el año 1895 demostró que los tumores descritos por Sanger eran invariablemente secuelas de embarazos normales, abortos, molas hidatidiformes o gestaciones ectópicas, y concluyó que los tumores eran de origen epitelial localizando su histogénesis en las vellosidades coriónicas, creando el término corioepitelioma. Estableció la relación entre el corioepitelioma y la mola hidatidiforme, que puede preceder en el tiempo a este tipo de tumores (Marcus, 2011).

De este modo, otros de los hitos fundamentales para el diagnóstico de la enfermedad trofoblástica gestacional, tras la histórica referencia en el año 1927 de Asheim y Zondek, sobre la fisiología y la bioquímica de la gonadotrofina coriónica (hCG), fue la demostración

de Fels, Ehrhart y Zondeck del exceso de gonadotrofina coriónica en orina de pacientes con esta enfermedad, lo que ha sido determinante para el diagnóstico y seguimiento.

Roy Hertz y Min C. Li, trataron a una paciente con coriocarcinoma con metástasis pulmonares en el año 1955, siendo el primer caso de tumor sólido en humanos que había sido curado con tratamiento farmacológico. Hertz en sus estudios, estableció las dosis estandarizadas e identificó efectos secundarios comunes de los fármacos y de su toxicidad. De este modo en el año 1962, la tasa de curación del previamente fatal coriocarcinoma, había mejorado significativamente al 80% (Marcus, 2011).

Hacia el año 1980, basados en los trabajos de Vassilakos, Szulman y Kajii, se estableció una comprensión completa de la patogénesis de la mola y la ETG (Vassilakos, Riotton, & Kajii, 1977).

Desde el principio del siglo XX hasta nuestros días, las contribuciones al conocimiento de la enfermedad trofoblástica gestacional se han sucedido de forma exponencial, desde el punto de vista del diagnóstico mediante técnicas de biología molecular, genética e inmunohistoquímica y del tratamiento con el desarrollo de los quimioterápicos.

1.2. Embriología e histología del desarrollo placentario

Para conocer cómo se produce la alteración del trofoblasto en el desarrollo de la mola hidatidiforme humana, hemos de conocer primero el desarrollo normal de las estructuras del blastocisto.

Una vez que se ha producido la fecundación, los pronúcleos pierden sus membranas nucleares y replican su ADN, proporcionando a cada célula del cigoto de la fase bicelular una dotación diploide de cromosomas (Sadler, 2012; Welsch & Sobotta, 2010).

Tras la fase bicelular, se suceden una serie de divisiones mitóticas hasta formar una mórula de dieciséis células. Una vez que la mórula entra en el útero, en el día tercero o cuarto tras la fecundación empieza a penetrar líquido dentro de los espacios intercelulares de la masa celular interna hasta originar una cavidad única, el blastocele, dando lugar al blastocito. Las células de la masa celular interna o embrioblasto, se encuentran en un polo, mientras que las células de la masa celular externa o trofoblasto, que más adelante contribuirá a la formación de la placenta, se aplanan y forman la pared epitelial del blastocito (Benirschke, Burton, & Baergen, 2012).

1.2.1. Período prevellositario

Fase prelacunar

El primer paso de la implantación, la aposición con el endometrio, tiene lugar en el día sexto o séptimo en el polo embrionario o polo de implantación (Boyd & Hamilton, 1970; Enders, 2007) (Figura 2).

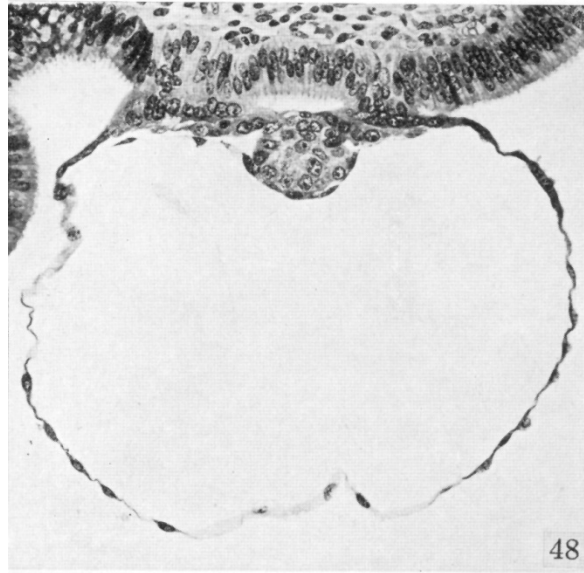


Figura 2. Microfotografía de un embrión en estadio 4 de Carnegie. Secciones in vivo de mono Rhesus (*Macaca mulatta*). El tamaño del blastocisto era de 0,42x 0,34 mm. La capa externa del trofoblasto está en contacto con el endometrio. Se inicia la diferenciación del sincitiotrofoblasto y del citotrofoblasto. (Imagen tomada de Heuser & Streeter, 1941).

Tras la aposición, la implantación se produce por la migración de las células del trofoblasto intermedio entre las células endometriales desplazándolas sin producir necrosis ni apoptosis (Schlafke & Enders, 1975).

En el octavo día de desarrollo, el blastocito está parcialmente sumergido en el estroma endometrial. En el área que queda por encima del embrioblasto, el trofoblasto se ha diferenciado en dos capas: una capa interna de células mononucleadas llamadas citotrofoblasto en proliferación activa, y una zona externa multinucleada sin límites celulares distinguibles, que se denomina sincitiotrofoblasto (Sadler, 2012). Las células del citotrofoblasto proliferan, se diferencian y fusionan, aumentando la masa celular del sincitiotrofoblasto, formando un manto completo sobre la superficie del blastocito. En el polo embrionario, este manto logra un espesor considerable y desarrolla ramificaciones

que invaden el endometrio. Esta fase se conoce como período prelacunar (Wislocki & Streeter, 1938) (Figura 3).

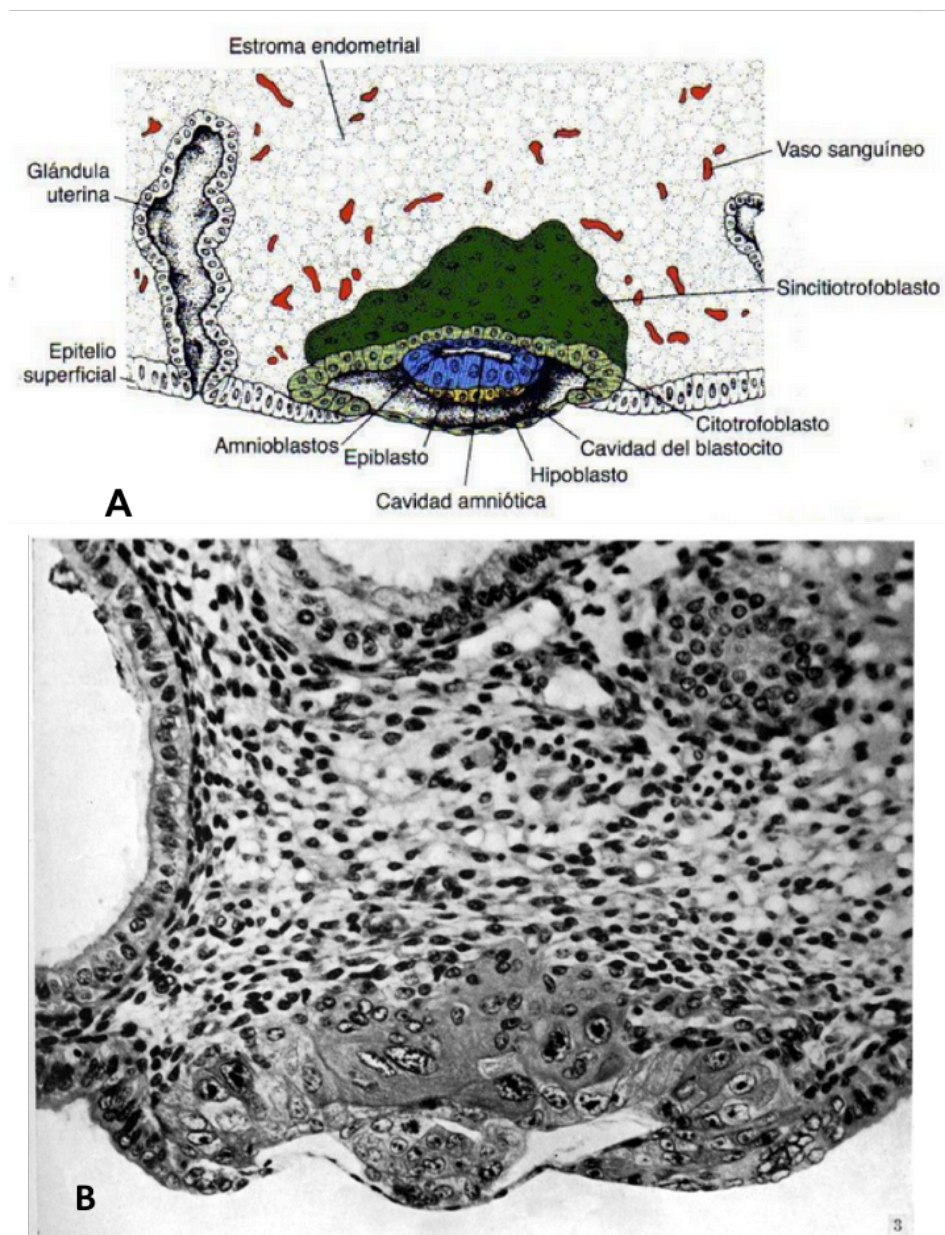
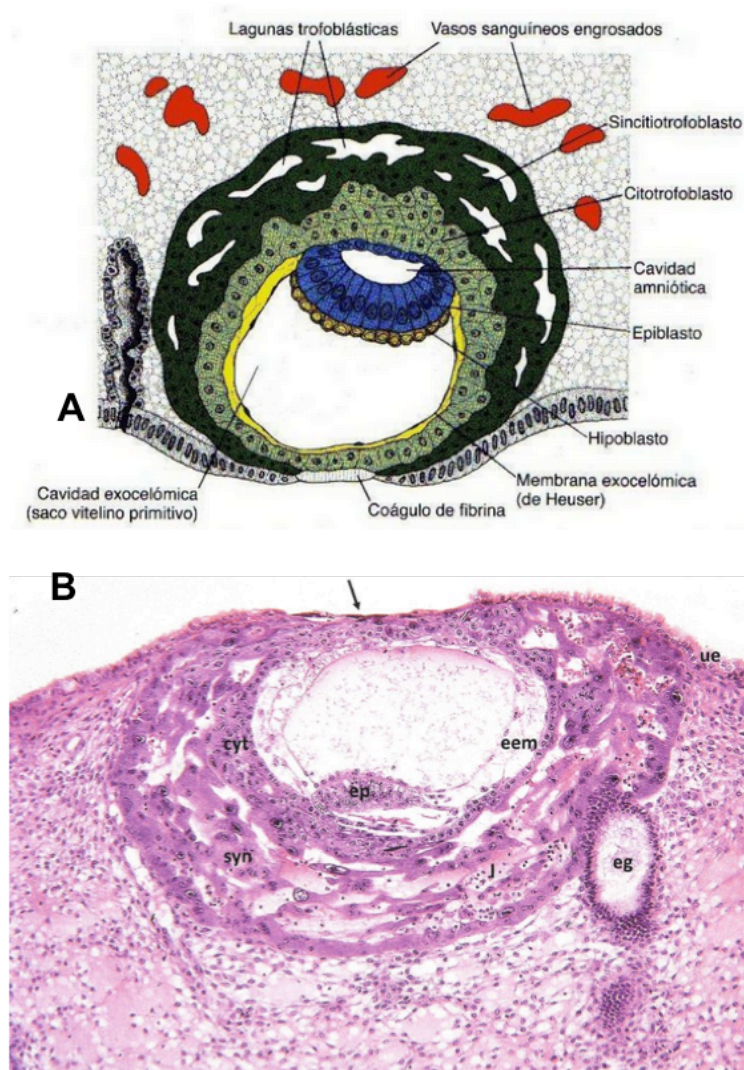


Figura 3. A Representación esquemática de blastocito humano de 7 días y medio en fase prelacunar. El trofoblasto está formado por una capa interna de células mononucleadas, el citotrofoblasto, y por una capa externa sin límites celulares distinguibles, el sincitiotrofoblasto. (Imagen tomada de Sadler, 2012, p. 43) **B.** Microfotografía de un embrión en estadio 5a de Carnegie. Implantación de un blastocito de 8 días en su fase prelacunar. El embrión, cuyo tamaño es inferior a 0,5 mm, orienta su cara dorsal hacia la parte superior de la imagen. Se aprecia el disco embrionario bilaminar. (Imagen tomada de Hertig y Rock, 1945 de la colección Carnegie).

Fase lacunar

Desde el día noveno hasta el día decimotercero aparecen vacuolas a nivel del sincitiotrofoblasto que se agrandan y confluyen formando grandes lagunas, lo que se conoce como período lacunar (Figuras 8). El sincitiotrofoblasto penetra en el estroma y erosiona el revestimiento endotelial de los sinusoides maternos, de forma que la sangre materna entra en el sistema lagunar (Hertig, Rock, & Adams, 1956). Hacia el día duodécimo del desarrollo, el blastocito está completamente inmerso en el estroma endometrial (Hertig & Rock, 1949) y se inicia la circulación uteroplacentaria (Burton, Jauniaux, & Watson, 1999; Hamilton & Boyd, 1960).

El sincitiotrofoblasto también erosiona las glándulas endometriales (Figura 4), que también contribuyen a la circulación en las lagunas (Burton, Watson, Hempstock, Skepper, & Jauniaux, 2002).



(Viene de página anterior) **Figura 4. A.** Representación esquemática de blastocito humano de 9 días. El sincitiotrofoblasto muestra un gran número de lagunas. (Imagen tomada de Sadler, 2012, p. 44). **B.** Microfotografía de un embrión humano en estadio 5b de Carnegie, casi completamente implantado, ilustrando el sincitiotrofoblasto (syn) en el que se están desarrollando las lagunas (l). eem: mesodermo extraembrionario; ue: epitelio uterino; flecha: coágulo de fibrina; eg: glándula endometrial; ep: epiblasto. (Imagen tomada de Benirschke et al., 2012, cortesía del Profesor Enders y la colección Carnegie).

1.2.2. Desarrollo vellositario

Al iniciarse la tercera semana, justo después de la aparición de eritrocitos maternos en las lagunas, las células del citotrofoblasto penetran en el sincitiotrofoblasto y forman columnas celulares, conociéndose como **vellosidades primarias** (Figura 5). Estas vellosidades están compuestas de un núcleo de citotrofoblasto cubierto por sincitiotrofoblasto (Benirschke et al., 2012). Las vellosidades se encuentran en toda la superficie del embrión y tienen una distribución radial (Welsch & Sobotta, 2010).

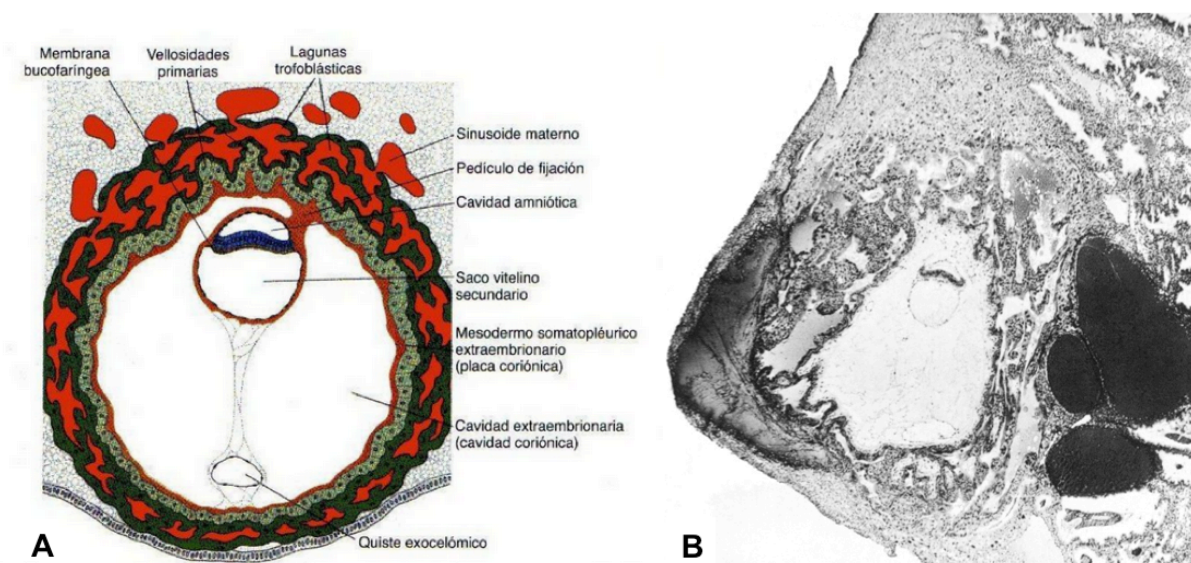


Figura 5. A. Representación esquemática de blastocito humano de 13 días. Las lagunas trofoblásticas están presentes tanto en el polo embrionario como en el polo abembrionario, y la circulación uteroplacentaria ya se ha iniciado. Nótese las vellosidades primarias la cavidad coriónica (Imagen tomada de Sadler, 2012, p. 59). **B.** Microfotografías de embrión en estadio 6 de Carnegie con 13 días de vida. La cavidad coriónica está rodeada por las capas celulares del trofoblasto, que empiezan a formar las vellosidades coriónicas. (Imagen tomada de Hertig y Rock, 1945 de la colección Carnegie).

Del día decimoséptimo al decimotercero, las células mesodérmicas penetran en el núcleo de las vellosidades primarias creciendo hacia la decidua, constituyendo las **vellosidades secundarias**.

Entre el final de la tercera semana y el comienzo de la cuarta semana, las células mesodérmicas del núcleo de la vellosidad empiezan a diferenciarse en células progenitoras hemangioblásticas (Demir, Kaufmann, Castellucci, Erben, & Kotowski, 1989; Dempsey, 1972; Robin et al., 2009), y éstas en pequeños vasos sanguíneos, para formar el sistema capilar veloso, conformando la **vellosidad terciaria o vellosidad placentaria definitiva** (Figura 6). Las células progenitoras dan lugar también a células madres hematopoyéticas, que se rodean por el endotelio dentro de los capilares primitivos. (Sadler, 2012; Welsch & Sobotta, 2010).

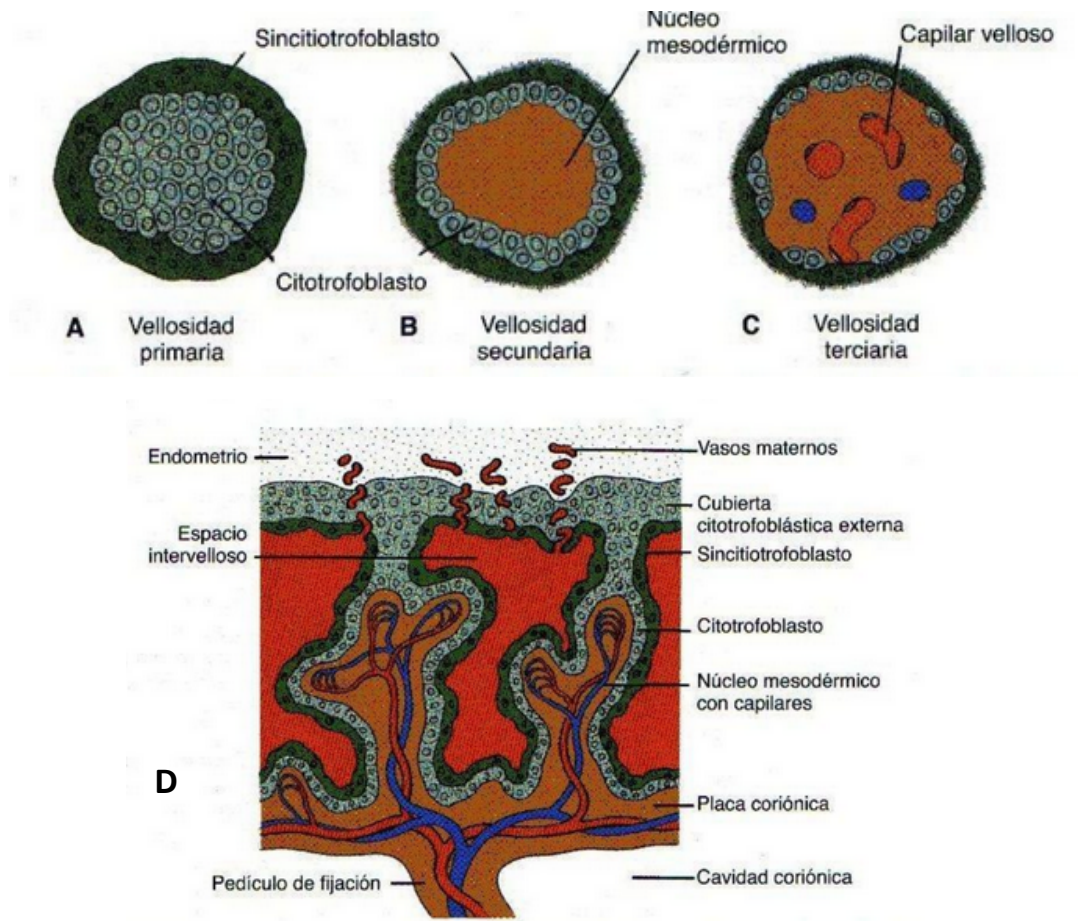


Figura 6. Representación esquemática del desarrollo de una vellosidad. **A.** Sección transversal de una vellosidad primaria que presenta un núcleo de células citotrofoblásticas cubierto por una capa de sincitio. **B.** Sección transversal de una vellosidad secundaria con un núcleo de msodermo cubierto por una sola capa de células citotrofoblásticas, que a su vez están cubiertas por sincitio. **C.** Mesodermo de la vellosidad terciaria,

que presenta diversas vénulas y capilares. **D.** Sección longitudinal a través de vellosidad al final de la tercera semana del desarrollo. Los vasos maternos penetran en la cubierta citotrofoblástica y entran en los espacios intervillosos. Los capilares de las vellosidades están en contacto con los vasos de la placa coriónica y el pedículo de fijación que, a su vez, están conectados con los vasos intraembrionarios (Imagen tomada de Sadler, 2012, pp. 60-61).

Las células citotrofoblásticas de las vellosidades, van penetrando progresivamente en el sincitiotrofoblasto, hasta alcanzar el endometrio materno, formando una cubierta citotrofoblástica materna que rodea todo el trofoblasto y une firmemente el saco coriónico al tejido endometrial materno (Figura 7).

Las vellosidades que se extienden desde la placa coriónica hasta la decidua basal reciben el nombre de **vellosidades de anclaje o troncales o de fijación**. Las vellosidades que nacen de las vellosidades troncales, se denominan **vellosidades libres** (Welsch & Sobotta, 2010).

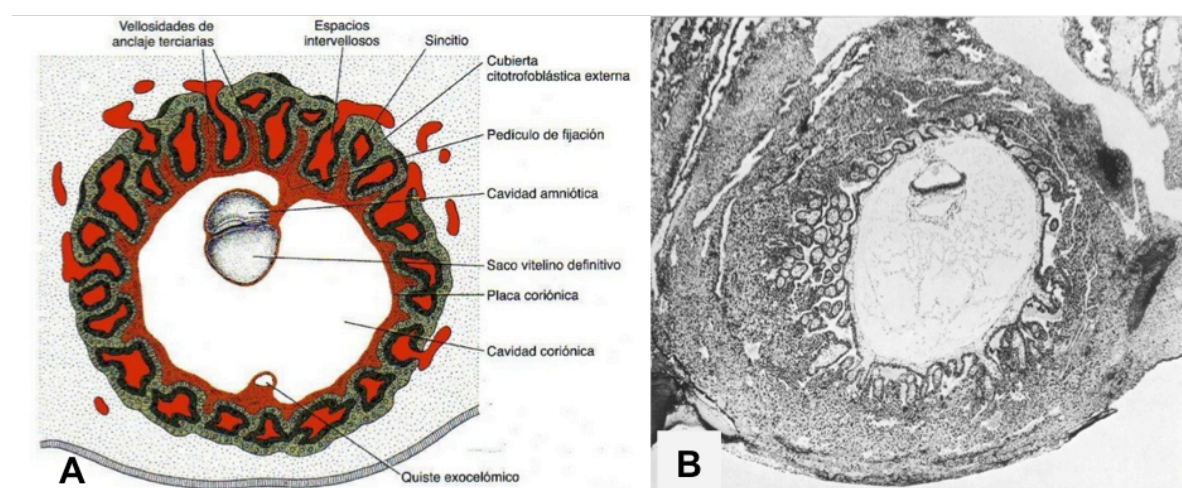


Figura 7. A. Representación esquemática de embrión y trofoblasto al final de la tercera semana. Las vellosidades de anclaje secundarias y terciarias confieren al trofoblasto un característico aspecto radial. Los espacios intervillosos que se encuentran por todo el trofoblasto, están revestidos por sincitiotrofoblasto. Las células citotrofoblásticas rodean totalmente el trofoblasto y están en contacto directo con el endometrio. El embrión está suspendido dentro de la cavidad coriónica por el pedículo de fijación. (Imagen tomada de Sadler, 2012, p. 60). **B.** Microfotografía de embrión entre 18 y 21 días, en estadio de Carnegie 7. (Imagen tomada de O'Rahilly and Müller, 1987 de la colección Carnegie).

1.2.3. Nutrición histotrófica y nutrición hemotrófica

La circulación fetoplacentaria completa se establece alrededor de la sexta semana. Pero no es hasta el final del primer trimestre cuando comienza el flujo efectivo en el momento en que se establece la circulación arterial materna a la placenta (Benirschke et al., 2012).

Durante el primer trimestre hasta la semana décima, los espacios intervillosos están ocupados por un filtrado del plasma (Schaaps & Hustin, 1988), a través de los espacios intercelulares de las terminaciones trofoblásticas, y de secreciones de las glándulas endometriales (Burton et al., 2002), que aparecen morfológicamente activas con acúmulos de glucógeno. La transferencia de nutrientes al feto en esta fase de la gestación se produce de forma histiotrófica, es decir, mediante el material acumulado en el espacio intervilloso, derivado del endometrio y de las glándulas endometriales.

Estas secreciones glandulares aportan micronutrientes, lípidos, carbohidratos y proteínas, que serán fagocitadas por el sincitiotrofoblasto, y que proporcionan una importante fuente de nutrientes a la unidad feto-placentaria, y múltiples factores de crecimiento y citoquinas (factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), factor inhibidor de leucemia (LIF), factor de crecimiento transformante beta (TFG β)), que estimulan la proliferación de los tejidos placentarios. Todos estos factores presentan receptores en los tejidos placentarios en el primer trimestre (Burton, Jauniaux, & Charnock-Jones, 2007; Burton, Scioscia, & Rademacher, 2011; Hempstock, Cindrova-Davies, Jauniaux, & Burton, 2004). Las glándulas deciduales producen un gran número de glicoproteínas que actúan como inmunomoduladoras, y otras proteínas que son importantes en la inmunidad innata contra las infecciones (defensinas y la *whey acidic protein* (WAP)) (Burton et al., 2007).

El periodo de nutrición histotrófica se extiende durante toda la organogénesis, y finaliza cuando se establece la circulación uteroplacentaria, iniciándose la vía hemotrófica de aporte de nutrientes al feto, al principio ya del segundo trimestre.

En la décima semana de gestación, la sangre materna entra en la placenta procedente de las arterias espirales uterinas tras la invasión endovascular de éstas por las células citotrofoblásticas de las vellosidades de anclaje, que reemplazan a las células endoteliales maternas, generando vasos híbridos que contienen células fetales y maternas. La invasión

de las arterias espirales, transforma estos vasos de pequeño diámetro y alta resistencia en vasos de gran diámetro y baja resistencia (Sadler, 2012).

1.2.4. Regresión vellositaria y formación de la placenta definitiva

A partir de la décima semana de gestación en el polo abembrionario las vellosidades involucionan constituyendo el corion liso y en el polo embrionario las vellosidades crecen y se ramifican constituyendo el corion frondoso.

Al inicio del cuarto mes la placenta consta de una parte fetal formada por el corion frondoso y una parte materna formada por la decidua basal. En la zona de unión se entremezclan las células deciduales con los trofoblastos. La mayoría de las células citotrofoblásticas han degenerado y entre ambas placas, se encuentran los espacios intervillosos llenos de sangre materna que están revestidos de sincitio fetal (Sadler, 2012; Welsch & Sobotta, 2010) (Figura 8).

Durante el cuarto y quinto mes de gestación, se forman tabiques deciduales que se proyectan dentro de los espacios intervillosos dividiendo la placenta en distintos compartimentos o cotiledones (Benirschke et al., 2012). Los cotiledones reciben la sangre a través de las arterias espirales que perforan la placenta decidua y entran en los espacios intervillosos. La presión en las arterias uterinas impulsa la sangre hacia los espacios intervillosos, bañando las vellosidades con sangre oxigenada, y realizándose el intercambio placentario en las vellosidades cuyos vasos fetales están en contacto íntimo con la membrana sincitial que las recubre. Cuando la presión disminuye, la sangre se retira de la placa coriónica y se dirige a la decidua, donde penetra en las venas del endometrio.



Figura 8. La placenta humana madura está compuesta por la placa coriónica (CP) y la placa basal (BP), que circunscriben los espacios intervellosos (IVS). Las vellosidades coriónicas fetales vascularizadas, se proyectan desde la placa coriónica dentro del espacio intervellosos, y están directamente rodeadas por la sangre materna que circula a través de los espacios intervellosos. P: lecho placentario, M: miometrio, CL: lecho coriónico, A: amnios, MZ: zona marginal entre la placenta y las membranas fetales, con obliteración del espacio intervellosos, S: septo placentario, UC: cordón umbilical. (Imagen tomada de Benirschke et al., 2012, p. 33).

1.2.5. Estructura básica del árbol vellositario

Todas las vellosidades coriónicas tienen la misma estructura básica (Benirschke et al., 2012):

- **Sincitiotrofoblasto:** capa epitelial ininterrumpida, que separa el interior de la vellosidad de la sangre materna. No está compuesta por células individuales, sino que se trata de una estructura continua multinucleada sin separación celular. Existen zonas diferenciadas como las membranas vasculosincitiales, que son las zonas con menor distancia entre las circulaciones materna y fetal.

Los nudos sincitiales, brotes y puentes, son las zonas de acumulación de núcleos que protruyen hacia el espacio intervilosario.

- **Citotrofoblasto:** bajo el sincitiotrofoblasto, existe una capa de citotrofoblasto de células individuales, las células de Langhans. Esta población celular contiene las células pluripotenciales que constituye el soporte del crecimiento y la regeneración del sincitiotrofoblasto. Al principio de la gestación es prácticamente completa y se hace discontinua.
- **Membrana basal trofoblástica:** separa el sincitiotrofoblasto y el citotrofoblasto del estroma de la vellosidad.
- **Estroma:** está compuesto por células del tejido conectivo, macrófagos vellositarios (células de Hofbauer en los canales estromales), fibras de tejido conectivo.
- **Vasos sanguíneos:** desde arterias y venas en los troncos vellositarios hasta los capilares y sinusoides en las ramificaciones más periféricas.

1.2.6. Arquitectura del árbol vellositario

Las vellosidades placentarias, pueden ser clasificadas en diferentes subtipos que difieren principalmente en su calibre, estroma, y arquitectura vascular, posición en el árbol vellositario y función. La clasificación más empleada actualmente, fue introducida por Kauffmann en 1979. Esta clasificación reconoce los siguientes tipos de vellosidades:

A) Vellosidades mesenquimales

Son la primera generación de vellosidades terciarias que contienen el eje estromal vascularizado (Castellucci & Kaufmann, 1982). En la placenta a término suponen el 1% del volumen vellositario (Castellucci, Kosanke, Verdenelli, Huppertz, & Kaufmann, 2000). Derivan de los brotes trofoblásticos y preceden la formación de las vellosidades intermedias inmaduras.

Histológicamente poseen un trofoblasto grueso y son el tipo de vellosidad con mayor número de células de Langhans y con un índice de proliferación mayor. El estroma es laxo con algunas células de Hofbauer. Poseen capilares fetales pobremente desarrollados que nunca tienen dilataciones sinusoidales. En el extremo de crecimiento presentan brotes

trofoblásticos. (Demir, Kosanke, Kohnen, Kertschanska, & Kaufmann, 1997; Kohnen, Kertschanska, Demir, & Kaufmann, 1996) (Figura 9).

Su función durante las primeras semanas de gestación es la de proliferación vellositaria, intercambio materno-fetal y actividad endocrina.

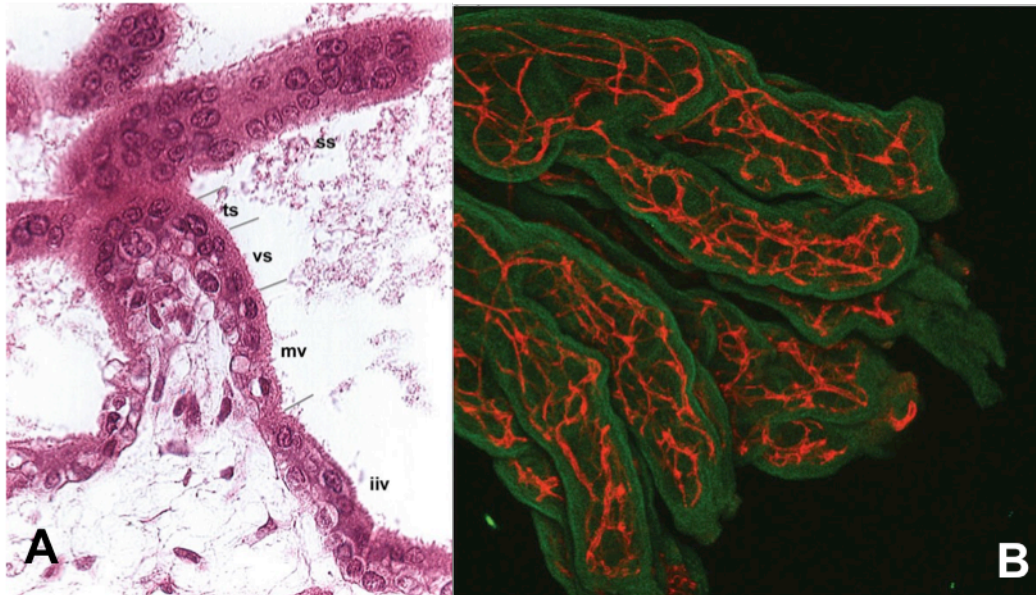


Figura 9. A. Sección longitudinal de una vellosidad mesenquimal: hay un grupo de brotes sincitiales formados (ss: *syncytial sprouts*); éstos están invadidos por citotrofoblasto (ts: *trophoblast sprout*), seguido de una invasión de estroma avascular celular (vs: *villous sprouts*). El desarrollo de capilares fetales, marca la transición a vellosidades mesenquimales (mv: *mesenchymal villus*). Las últimas ramificaciones son vellosidades intermedias inmaduras (iiv: *immature intermediate villus*). Tinción de hematoxilina-eosina \times 560. (Imagen tomada de Benirschke et al., 2012, p. 109). **B.** Proyección de puntos brillantes de un acúmulo de secciones ópticas de una vellosidad mesenquimal en la semana 6 con una red vascular compuesta principalmente de cordones hemangiogénicos. (Imagen tomada de Lisman et al., 2007)

B) Vellosidades intermedias inmaduras

Derivan de la maduración de las vellosidades mesenquimales y representan entre el 0-5% del volumen vellositario total en la placenta a término, persistiendo en pequeños grupos en la porción central del árbol vellositario actuando como zonas de crecimiento.

Su característica más típica es el estroma reticular: múltiples canales líquidos delimitados por una red de procesos citoplasmáticos de las células estromales, que contienen en su interior células de Hofbauer y aseguran el transporte de oxígeno y nutrientes a través del árbol vellositario, antes de el establecimiento de la circulación coriónica en la semana octava (Castellucci & Kaufmann, 1982; Kaufmann, Stark, & Stegner, 1977). Por su aspecto, son similares a las vellosidades edematosas descritas en

diversas situaciones (mola, diabetes, infecciones como sífilis, toxoplasma o citomegalovirus), que probablemente sean en realidad, vellosidades intermedias inmaduras predominantes (Kaufmann et al., 1977) (Figura 10).

Las vellosidades intermedias inmaduras son consideradas los centros de crecimiento del árbol vellositario y se transforman en troncos vellositarios. Producen brotes trofoblásticos verdaderos que se transforman en vellosidades mesenquimales como precursores de otros tipos de vellosidades.



Figura 10. Corte semifino de una vellosidad intermedia inmadura en la semana 22 de gestación, con el típico estroma reticular. Los macrófagos vacuolados están localizados en los canales estromales, que están desprovistos de fibras de tejido conectivo y por lo tanto, aparecen como agujeros vacíos. En cortes histológicos débilmente teñidos, esta característica puede ser malinterpretada como edema vellositario $\times 520$. (Imagen tomada de Benirschke et al., 2012, p. 107, perteneciente a Kaufmann.).

C) Vellosidades troncales

Proporcionan el principal soporte estructural al árbol vellositario. Constituyen el 20-25% del total del volumen placentario.

Histológicamente, provienen de la transformación de las vellosidades intermedias inmaduras y están caracterizadas por un estroma fibroso y la presencia de arterias, venas o arteriales y vénulas dependiendo de su localización. Los vasos presentan pared media y adventicia (Figura 11).

Los troncos vellositarios ejercen la función de soporte mecánico del árbol vellositario. Debido a su bajo grado de capilarización fetal y a los cambios degenerativos del trofoblasto, no presentan actividad de intercambio ni endocrina. La presencia de grandes

vasos fetales con paredes musculares gruesas y células contráctiles contribuyen a la autorregulación del sistema vascular fetoplacentario (Farley, Graham, & Smith, 2004).

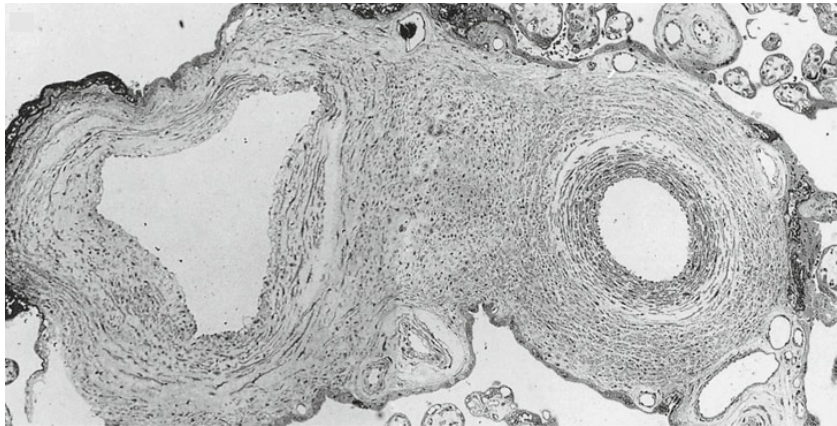


Figura 11. Corte semifino de un gran tronco vellositario. Las adventicias de la arteria (derecha) y vena (izquierda), directamente se continúan con el estroma fibroso circundante de la vellosidad. Superficialmente aparecen vasos pequeños de la red paravascular. La cubierta trofoblástica ha sido reemplazada por material fibrionide $\times 115$. (Imagen tomada de Benirschke et al., 2012, p. 103)

D) Vellosidades intermedias maduras

Son vellosidades periféricas largas, delgadas y no ramificadas. Suponen el 25% del volumen vellositario total. Las vellosidades intermedias maduras tienen forma ondulada, naciendo un grupo de vellosidades terminales en cada convexidad. No poseen vasos con capa media y adventicia. Se originan por maduración de las vellosidades mesenquimales durante el tercer trimestre gestacional.

El trofoblasto de las vellosidades intermedias maduras es mucho más delgado que en las vellosidades maduras. Donde el trofoblasto cubre los capilares, se reduce en grosor hasta $1\ \mu\text{m}$, contribuyendo a la formación de la membrana vasculosinicial. En secciones transversas, si la superficie estromal contiene menos del 50% de luces vasculares, se considera que se trata de una vellosidad intermedia madura. Si la superficie es mayor del 50%, se considera que se trata de una vellosidad terminal (Figura 12).

Las vellosidades intermedias maduras sostienen las vellosidades terminales. Su alto grado de vascularización y gran superficie, las hace importantes para el intercambio materno fetal y también es un lugar de producción hormonal (Benirschke et al., 2012).

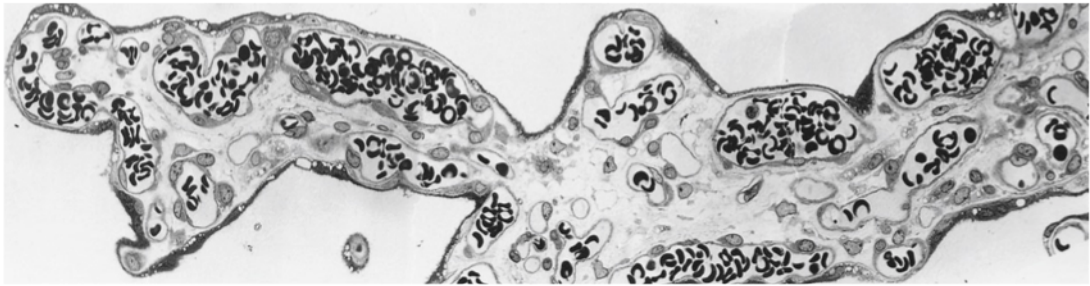


Figura 12. Corte semifino de la rica vascularización periférica del final de una vellosidad intermedia madura (mitad derecha) con una vellosidad terminal (mitad izquierda) naciendo de una zona estrecha (zona central). Los vasos fetales muestran una típica composición de capilares estrechos y sinusoides dilatados. Los últimos están íntimamente relacionados con la superficie trofoblástica, formando membranas vasculosincitiales. $\times 430$. (Imagen tomada de Kaufmann, Sen, & Schweikhart, 1979).

E) Vellosidades terminales

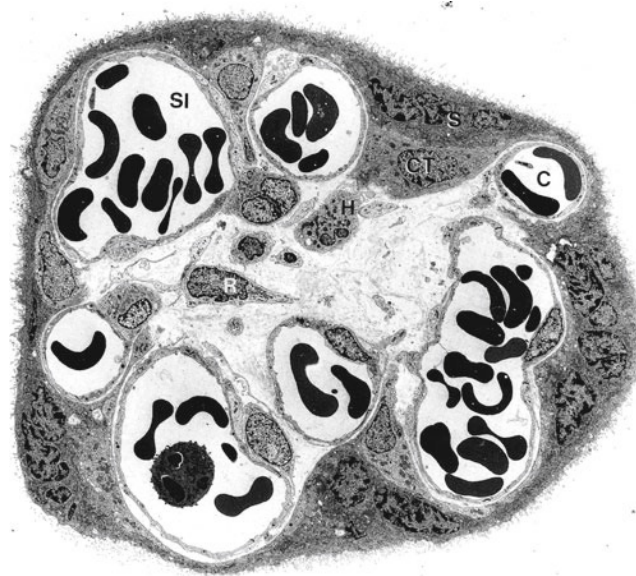


Figura 13. Microscopía electrónica de una vellosidad terminal que ilustra el alto grado de capilarización fetal, con algunos capilares (C), estrechos y otros dilatados, formando sinusoides (SI). El escaso tejido conectivo está compuesto por macrófagos (H), fibroblastos o pequeñas células reticulares (R), y un estroma de fibras de tejido conectivo. El estroma está rodeado de una capa variable de sincitiotrofoblasto (S), debajo del que pueden apreciarse algunas células de citotrofoblasto (CT) $\times 2,000$. (Imagen tomada de Benirschke et al., 2012, p. 108).

Son las agregaciones vellositarias finales, arracimadas, muy capilarizadas y con sinusoides o capilares dilatados, que se originan en la superficie de las vellosidades intermedias maduras. En la placenta a término, las vellosidades terminales constituyen el

40% del volumen vellositario. La suma de su superficie equivale al 50% del total de la superficie vellositaria. Son propias del tercer trimestre gestacional y constituyen la forma vellositaria más adaptada a la función de intercambio materno-fetal.

Histológicamente, poseen una fina capa de sincitiotrofoblasto de cobertura y capilares sinusoidales dilatados que ocupan más del 50% del volumen estromal (Feneley & Burton, 1991). Las membranas vasculosincitiales constituyen el 30-40% de su superficie, siendo el lugar de intercambio por difusión más efectivo. La formación de las vellosidades terminales, tiene relación con el crecimiento longitudinal e incurvación de los capilares de las vellosidades intermedias maduras (Figura 13). El alto grado de vascularización y la distancia mínima de difusión maternofetal, hace que esta vellosidad, sea el lugar más importante para el intercambio por difusión.

1.2.7. Angioarquitectura de las vellosidades

Los troncos vellositarios contienen una arteria y una vena en una posición central. El endotelio, está rodeado por algunas capas de células de músculo liso, y la adventicia se continúa con el tejido conectivo circundante. Hay un número variable de arteriolas y vénulas junto con estos dos vasos. La red paravascular de capilares, sigue una trayectoria recta, paralela al eje longitudinal de la vellosidad, conectada a la arteria y vena por segmentos cortos venulares y arteriolares. Los vasos de las vellosidades intermedias maduras son continuación directa de los vasos más pequeños de los troncos vellositarios, de modo que las arteriolas continúan directamente en capilares con reducción del diámetro y pérdida del músculo liso. En la mitad distal de las vellosidades intermedias maduras, la red de capilares paravasculares está ausente. Finalmente, en las vellosidades terminales, hay un aumento de bucles capilares, acompañados de un aumento de sinusoides y una reducción del tejido conectivo, lo que da lugar a las membranas vasculosincitiales (Kaufmann, Mayhew, & Charnock-Jones, 2004) (Figura 14).

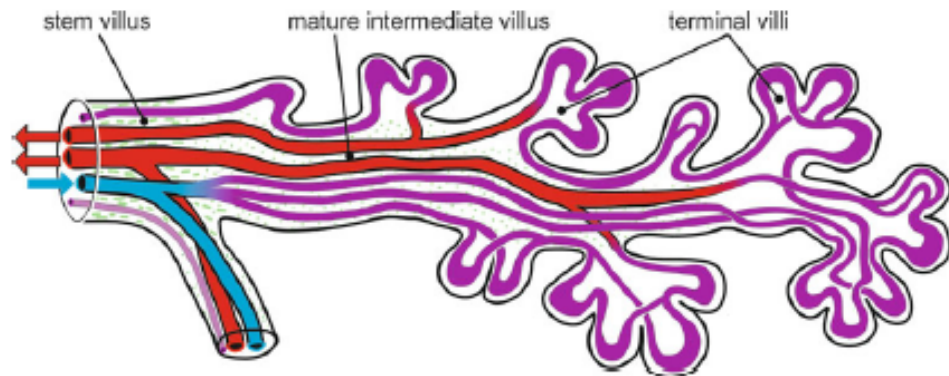


Figura 14. Esquema de la disposición de los vasos fetales en un grupo de vellosidades terminales derivados de una vellosidad intermedia madura. Nótese la compleja formación de los terminales capilares. Azul: arterias y arteriolas fetales, lila: capilares y sinusoides de las vellosidades fetales, rojo: vénulas y venas fetales. (Imagen tomada de Kaufmann et al., 2004).

1.3. Epidemiología de mola hidatidiforme

La incidencia publicada de la enfermedad trofoblástica gestacional, tiene una amplia variabilidad.

La enfermedad trofoblástica gestacional es más frecuente en Asia, África y Latinoamérica, que en Europa, América del Norte y Australia, lo que podría deberse a diferencias en la prevalencia, en los datos hospitalarios, en la población o en la metodología de los estudios.

En los primeros estudios epidemiológicos en Reino Unido, la incidencia de la mola hidatidiforme completa es alrededor de 1 por cada 1000 gestaciones y la de la mola parcial es de 3 por cada 1000 gestaciones (Newlands, Paradinas, & Fisher, 1999). La incidencia en América del Norte, Europa y Oceanía es aproximadamente de 0,5-1/1000 gestaciones, en América del Sur de 1,5 a 6 por 1000 gestaciones y en el Sureste de Asia oscila entre 1-2 casos por cada 1000 gestaciones en Japón y China, hasta 12 casos por cada 1000 gestaciones en Indonesia, India y Turquía (Mangili et al., 2014; Steigrad, 2003).

Los factores etiológicos que influyen en la incidencia de la mola hidatidiforme son:

1. La edad materna: existe un aumento de la incidencia de la mola hidatidiforme en las edades extremas del período reproductivo. Las adolescentes tienen un riesgo aumentado de 1,5 a 2 veces, mientras que las mujeres mayores de 40 años, tienen cinco veces o más riesgo de presentar una mola hidatidiforme, porque sus óvulos son más

susceptibles de fertilizaciones anormales. (Mangili et al., 2014; Seckl, Sebire, & Berkowitz, 2010; Steigrad, 2003).

2. La dieta: se ha asociado un riesgo aumentado de mola hidatidiforme con el consumo reducido de carotenos y grasa animal (Berkowitz, Cramer, et al., 1985; Seckl et al., 2010).

3. Las gestaciones molares previas: después de una gestación molar, el riesgo adicional de un embarazo molar, aumenta un 1%. Después de dos gestaciones molares, el riesgo aumenta un 15-20%, y el riesgo no desciende si se cambia de pareja. Algunas gestaciones molares de repetición, son debidas a enfermedad molar biparental familiar o esporádica (Mangili et al., 2014; Seckl et al., 2010).

Los principales factores de riesgo para el desarrollo de una gestación molar son las edades extremas maternas y la historia de un embarazo molar previo.

La frecuencia de coriocarcinoma de estima en 1 de cada 50000 gestaciones, y los tumores del sitio placentario, suponen un 0,2% de los casos de ETG en el Reino Unido.

El riesgo de la neoplasia trofoblástica gestacional (NTG), puede deberse a factores hormonales: hay un aumento del riesgo en mujeres con menarquia después de los 12 años, flujo menstrual escaso y uso previo de anticonceptivos orales. El riesgo de malignización tras la mola hidatidiforme, ha sido asociado en algunos estudios, con el uso de anticonceptivos orales si se han iniciado cuando las concentraciones de hCG, estaban en aumento (Seckl et al., 2010).

1.4. Etiología y genética de la mola hidatidiforme

El desarrollo de la mola hidatidiforme, parece estar asociado con un exceso de la dotación haploide paterna de cromosomas.

Aproximadamente en el 80% de los casos, la mola hidatidiforme completa resulta de la fertilización de un óvulo sin cromosomas maternos por un espermatozoide haploide que duplica su ADN, resultando un cariotipo androgenético (46XX), en el que todos los cromosomas son derivados de la dotación genética del padre (Kajii & Ohama, 1977). Un 20% de las molas completas son heterocigotas 46XY, y provienen de la fertilización de dos espermatozoides (Hoffner & Surti, 2012; Pattillo, Sasaki, Katayama, Roesler, & Mattingly, 1981). Se han descrito en pacientes con enfermedad recurrente, que pueden tener una enfermedad biparental molar que contiene genoma materno y paterno (Fisher, Hodges, &

Newlands, 2004). Estas mujeres tienen con frecuencia una historia familiar de gestaciones molares recurrentes. Esta condición es autosómica recesiva y los estudios genéticos en estas familias señalan que los genes implicados se encuentran en el cromosoma 19q13.3-13.4 en el 70% de los casos y en el gen KHDC3L, en el 5% de los casos (Mangili et al., 2014).

Las molas parciales tienen también dominancia paterna en su genoma, siendo típicamente triploides, como resultado de la fertilización de un óvulo aparentemente normal por dos espermatozoides (en el 90% de los casos) o menos comúnmente (10% de los casos) provienen de un espermatozoide que duplica la dotación cromosómica (69XXX, 69XXY o 69XYY)(Buza & Hui, 2014) (Figura 15).

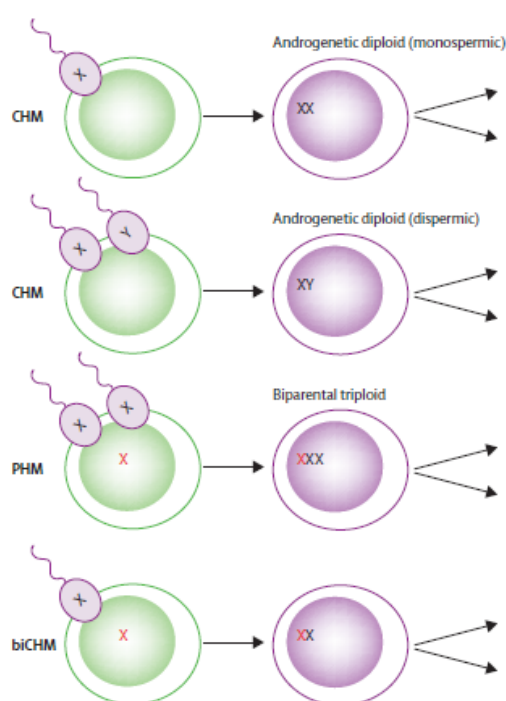


Figura 15. Origen genético de las gestaciones molares. Derivación del cariotipo de las molas parciales y completas y de la mola hidatidiforme biparental. (CHM: mola hidatidiforme completa, PHM: mola hidatidiforme parcial, biCHM: mola hidatidiforme completa biparental). Genes maternos en rojo y genes paternos en negro. (Imagen tomada de Seckl et al., 2010).

1.5. Embriología e histología de la mola hidatidiforme

Se denomina ETG a un conjunto de procesos benignos y malignos, derivados de una proliferación anormal del trofoblasto de la placenta humana y del genoma paterno, con una contribución materna ocasional, incluyendo la mola hidatidiforme.

La mola hidatidiforme y el coriocarcinoma provienen de la proliferación anormal del trofoblasto vellositario, mientras que los tumores del lecho placentario o la reacción exagerada del lecho placentario provienen del trofoblasto extravellositario.

Las molas hidatidiformes completas y parciales, presentan características histopatológicas diferenciadas, incluso en el primer trimestre. Las características comunes a ambas patologías son los grados variables de dismorfología vellositaria y cambios hidrópicos y la hiperplasia del trofoblasto vellositario.

El diagnóstico de la mola es esencialmente anatomopatológico, aunque se ha hecho más difícil en los últimos años porque la evacuación se realiza a edades gestacionales más tempranas (media de 8-9 semanas en Reino Unido) (Sebire, 2010; Seckl et al., 2010), por lo que ha de ser apoyado por técnicas citogenéticas y de inmunohistoquímica. Sin embargo, con tejido adecuado y criterios diagnósticos apropiados, la mayoría de los casos de molas completas y parciales pueden ser correctamente identificados incluso en el primer trimestre.

1.5.1. Características de la mola completa

Macroscópicamente presenta vesículas translúcidas que son la expresión de las vellosidades hidrópicas, edematosas y aumentadas de tamaño, que ofrece el aspecto característicamente descrito como racimo de uvas. Las vesículas pueden medir hasta 3 cm de diámetro en las molas de edad gestacional avanzada (Figura 16).



Figura 16. Aspecto macroscópico de la mola hidatidiforme completa como racimos de uvas. (Imagen tomada de Cheung, 2003).

Las características histopatológicas clásicas de la mola completa en el segundo trimestre comprenden fundamentalmente la hiperplasia circunferencial del trofoblasto vellositario, pleomorfismo nuclear del trofoblasto, formación de cisternas centrales vellositarias, ausencia de vasos sanguíneos vellositarios e hidrops vellositario generalizado (Figura 17).

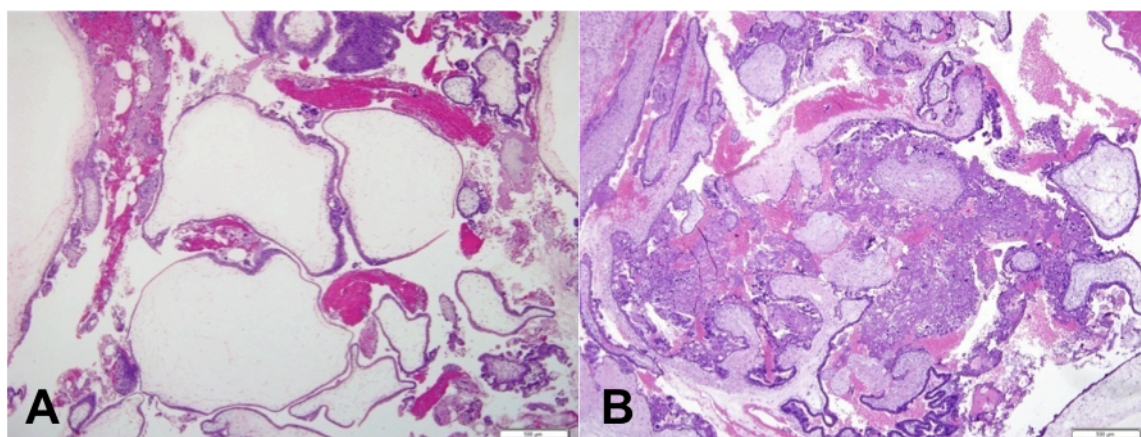


Figura 17. Mola hidatidiforme completa del segundo trimestre. **A.** Vellosidades aumentadas de tamaño, apreciándose edema vellositario muy marcado con formación de cisternas centrales. Tinción de hematoxilina-eosina 4X. **B.** Cambios vellositarios hidrópicos con marcada hiperplasia del trofoblasto que incluye el citotrofoblasto y el sincitiotrofoblasto y atipia trofoblástica. Tinción de hematoxilina-eosina 4X. (Imágenes reconstruidas de las muestras obtenidas del Biobanco del Sistema Público de Andalucía, a través del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Virgen del Rocío).

Muchas de estas características no están presentes en el primer trimestre y otros criterios histopatológicos son más importantes (Baergen, 2011; Kurman, Ellenson, & Ronnett, 2012; Sebire, 2010) (Figuras 18 y 19):

- Hiperplasia del trofoblasto: está siempre presente y es un requerimiento para el diagnóstico, pero la extensión puede ser variable: puede abarcar toda la circunferencia vellositaria o puede ser focal.
- Atipia trofoblástica: está presente el pleomorfismo del trofoblasto y la vacuolización del citoplasma del sincitiotrofoblasto.
- Cambios vellositarios hidrópicos: están presentes habitualmente en el primer trimestre y pueden ser leves, irregulares y sólo observables al microscopio.

Pueden evidenciarse formación de cisternas, que son espacios acelulares centrales, que se forman cuando el tejido conectivo se separa.

- Vasos sanguíneos vellositarios: pueden estar presentes en las molas completas en edades precoces de la gestación, normalmente colapsados y vacíos, y su presencia no indica que se trate de una mola parcial, si existen otras características de mola completa.
- Debris de cariorrexis estromal: es una característica diagnóstica útil en la mola hidatidiforme completa precoz.
- Brotes vellositarios irregulares: es un hallazgo muy útil y característico de las molas muy tempranas, en el que pequeñas vellosidades parecen brotar de una vellosidad más grande.
- Pseudoinclusiones vellositarias: aparecen más grandes, ovoides y más irregulares que las pequeñas y redondas inclusiones de la mola parcial.
- Tejido fetal: Aunque en la mayoría de los casos el embrión está ausente, los vasos sanguíneos fetales y las células rojas nucleadas fetales, pueden encontrarse en las molas completas, y en casos raros, un embrión puede estar presente. Esto es posible dado que el estroma de las vellosidades deriva del mesénquima embrionario.

Existen varias razones por las que es excepcional encontrar embrión en las molas completas. En primer lugar, es frecuente la muerte embrionaria temprana en las molas completas, dado que la mayoría de las molas son homocigóticas para todos sus genes y existen genes letales recesivos que conducirían a la muerte fetal. En segundo lugar, los fetos pequeños y mal desarrollados pueden no ser identificados en el tejido vellositario. En tercer lugar, la incidencia de mola completa en los abortos precoces, es mucho menor de la esperada, probablemente porque en las fases tempranas en las que podría identificarse un embrión, es menos probable poder hacer el diagnóstico de mola.

Las molas monospermicas, dispermicas y biparentales son morfológicamente e inmunofenotípicamente idénticas (Baergen, 2011; Kurman et al., 2012; Sebire, 2010).

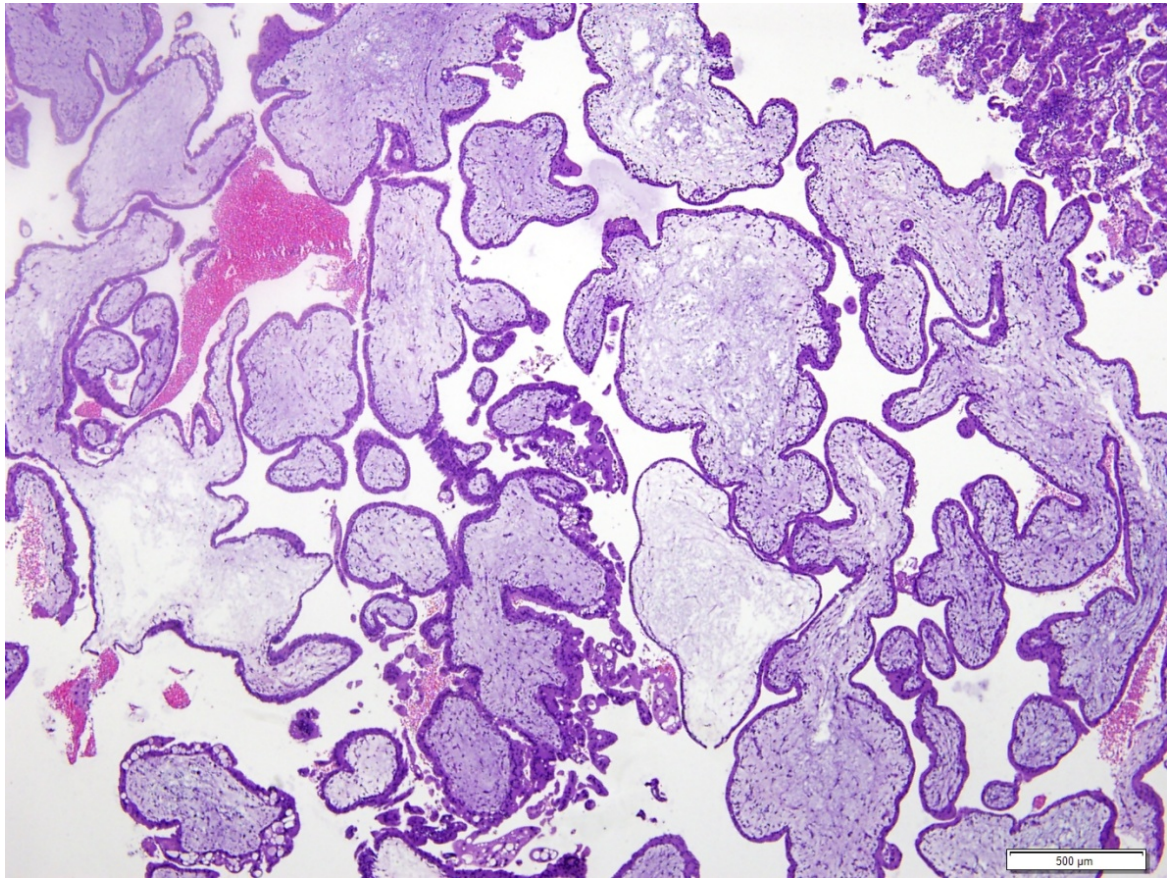


Figura 18. Microfotografía de una mola completa del primer trimestre (11 semanas de gestación), que demuestra hidrops vellositario, cisternas, arquitectura con brotes vellositarios, debris de cariorrexis estromal e hiperplasia trofoblástica anormal multifocal. Tinción de hematoxilina-eosina 4X. (Imágenes reconstruidas de las muestras obtenidas del Biobanco del Sistema Público de Andalucía, a través del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Virgen del Rocío).

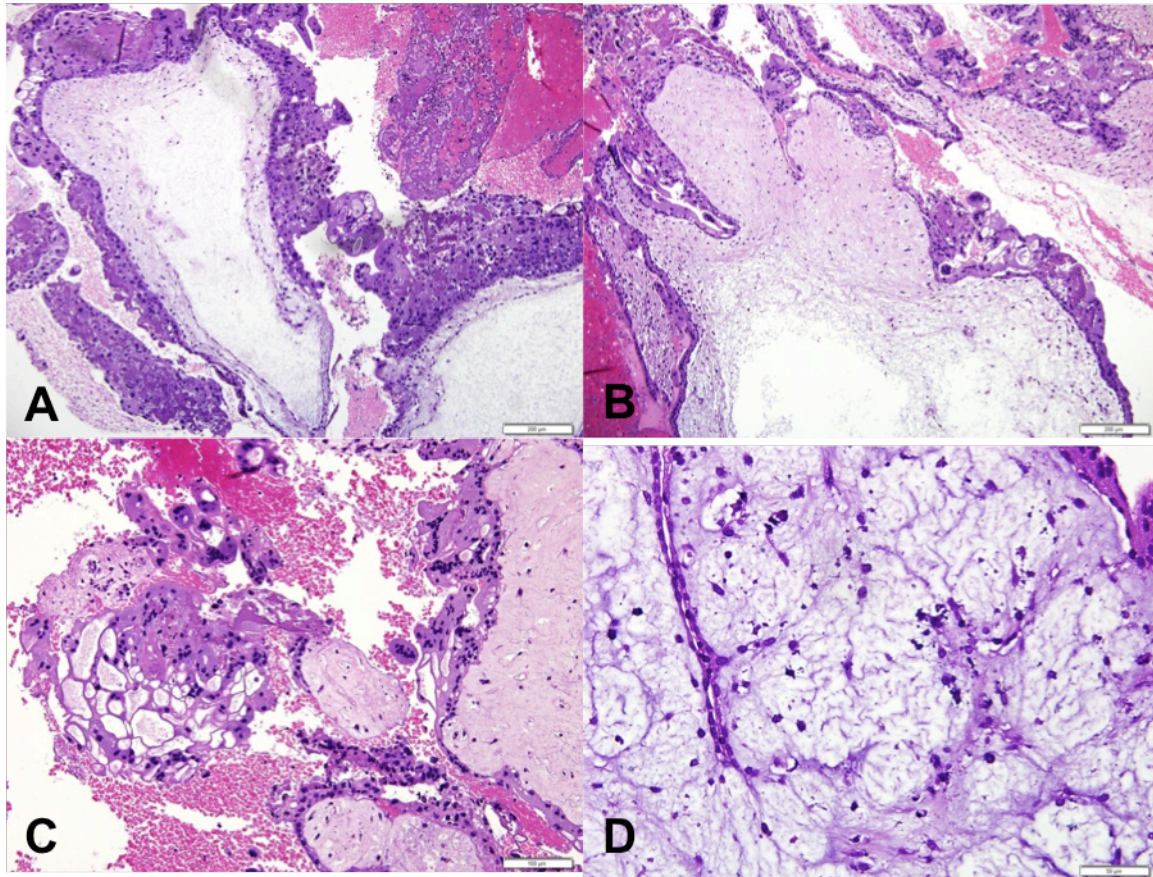


Figura 19. Microfotografías de la mola hidatidiforme completa precoz (primer trimestre). **A.** Degeneración hidrópica vellositaria con formación de cisternas vellositarias centrales. Se evidencia hiperplasia trofoblástica vellositaria. Tinción de hematoxilina-eosina (10X). **B.** Arquitectura de brotes vellositarios con cisternas centrales estromales. Hiperplasia trofoblástica y atipia del sincitiotrofoblasto. Tinción de hematoxilina-eosina (10X). **C.** Atipia trofoblástica: pleomorfismo del trofoblasto y vacuolización del citoplasma del sincitiotrofoblasto. Tinción de hematoxilina-eosina (20X). **D.** Debris estromales de cariorrexis. Tinción de hematoxilina-eosina (40X). (Imágenes reconstruidas de las muestras obtenidas del Biobanco del Sistema Público de Andalucía, a través del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Virgen del Rocío).

1.5.2. Características de la mola parcial

Macroscópicamente, el volumen de tejido es habitualmente pequeño. Las vellosidades son más pequeñas que las encontradas en la mola completa. Las características macroscópicas pueden no ser muy aparentes. En algunos casos un feto (con anomalías congénitas) o las membranas fetales, pueden estar presentes (Figura 20).



Figura 20. Aspecto macroscópico de mola hidatidiforme parcial con vellosidades hidrópicas y vellosidades de aspecto normal. (Imagen tomada de Kurman et al., 2012).

Las características histopatológicas clásicas de la mola parcial en el segundo trimestre demuestran hidrops vellositario irregular con dos poblaciones de vellosidades, en presencia de tejido fetal con leve hiperplasia trofoblástica (Figura 21).

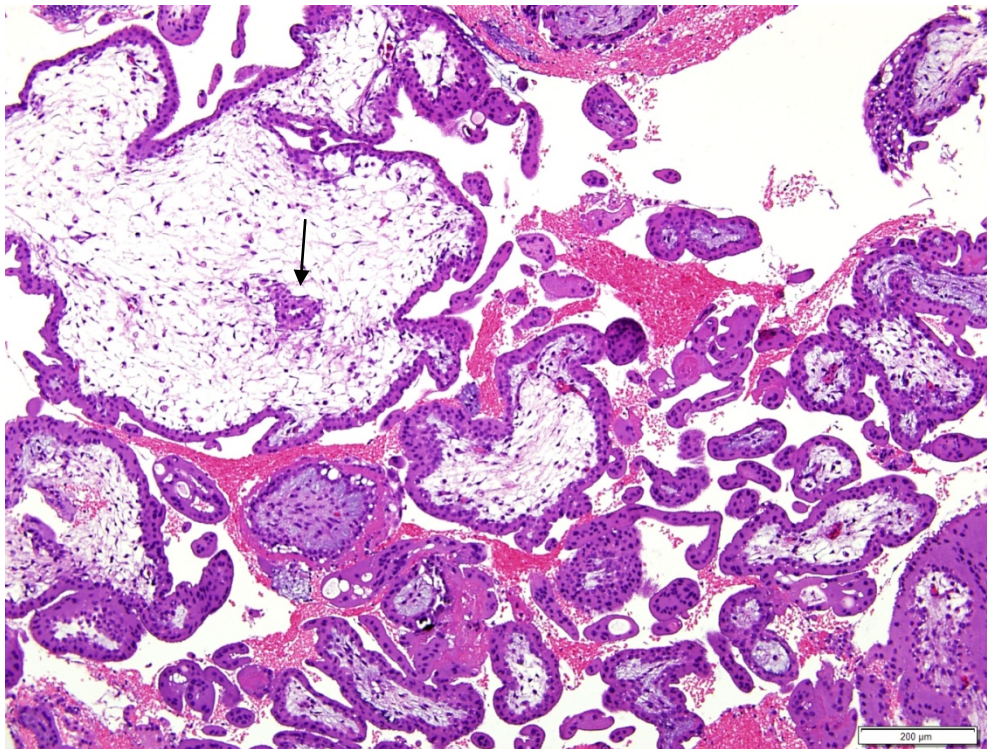


Figura 21. Mola parcial del segundo trimestre que muestra dos poblaciones vellositarias (vellosidades hidrópicas aumentadas de tamaño y de tamaño normal), superficie vellositaria festoneada, inclusiones trofoblásticas (flecha), mínima hiperplasia trofoblástica. Tinción de hematoxilina-eosina 10X. (Imágenes reconstruidas de las muestras obtenidas del Biobanco del Sistema Público de Andalucía, a través del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Virgen del Rocío).

Las características en el primer trimestre pueden ser más sutiles e incluyen (Baergen, 2011; Kurman et al., 2012; Sebire, 2010) (Figura 22):

- Hiperplasia trofoblástica: está siempre presente y es necesaria para el diagnóstico definitivo, pero puede ser leve e irregular. Es casi siempre focal y menos marcada que en la mola completa, y a menudo presenta un patrón vacuolado.
- Cambios vellositarios hidrópicos: están casi siempre presentes, pero normalmente afectan sólo a vellosidades dispersas y son muy leves, con ocasionales cisternas pobremente formadas.
- Vasos sanguíneos vellositarios: son normalmente numerosos y contienen células rojas fetales nucleadas.
- Vellosidades irregulares dentadas: tienen un reborde festoneado más que los brotes lisos observados en la mola completa. Presentan pseudoinclusiones pequeñas y redondas, que es una característica destacada de las molas parciales precoces.
- Fibrosis estromal vellositaria: con fibras de reticulina en la gestación temprana.
- Tejido fetal: existe habitualmente algún grado de desarrollo del embrión: células rojas fetales nucleadas, amnion y partes fetales.

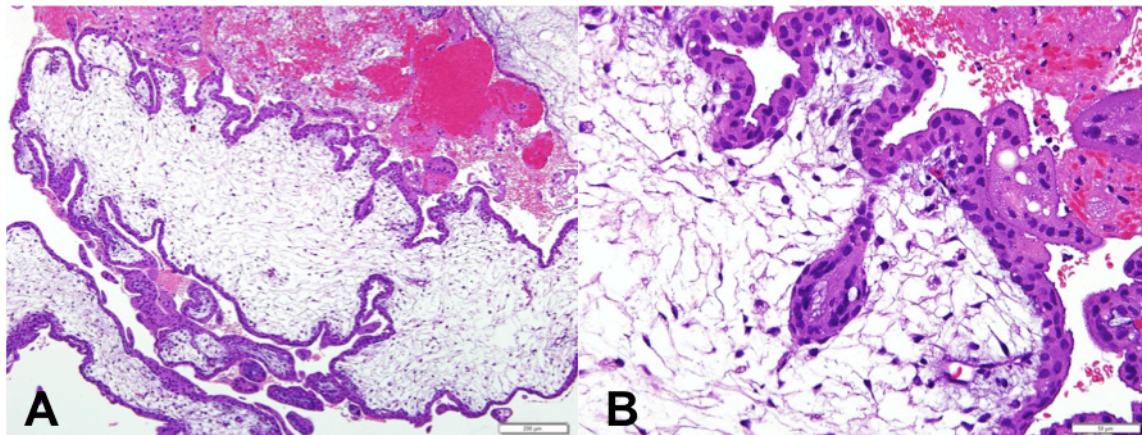


Figura 22. Características histomorfológicas de una mola parcial en la semana 10. A. Vellosidad hidrópica aumentada de tamaño con contornos festoneados y pseudoinclusión redondeada. La vascularización vellositaria es escasa, pero está presente de forma más evidente que en la mola completa. Menor hiperplasia trofoblástica. Tinción de hematoxilina-eosina 10X. B. Detalle de pseudoinclusión trofoblástica. Se aprecia un vaso vellositario. Tinción de hematoxilina-eosina 40X. (Imágenes reconstruidas de las muestras obtenidas del Biobanco del Sistema Público de Andalucía, a través del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Virgen del Rocío).

1.6. Clasificación de la enfermedad trofoblástica gestacional

Se han realizado múltiples clasificaciones de la enfermedad trofoblástica.

La ETG, representa un espectro único de patologías interrelacionadas, con el denominador común de una hipersecreción de hCG, que constituye un marcador tumoral sensible que se correlaciona bien con la progresión y persistencia de la enfermedad, siendo una excepción el tumor del sitio placentario, que produce lactógeno placentario (hPL). Estas patologías tienen tendencias variables a la invasión local y a las metástasis.

La clasificación de la enfermedad trofoblástica gestacional preconizada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (D.R. Genest, Berkowitz, Fisher, Newlands, & Feh, 2003), y que es ampliamente aceptada, incluye (Tabla 1):

MOLA HIDATIDIFORME: Mola completa Mola parcial Mola invasiva Mola metastásica
LESIONES TROFOBLÁSTICAS BENIGNAS (NO NEOPLÁSICAS, NO MOLARES): Reacción exagerada del lecho placentario Nódulos del lecho placentario
TUMORES TROFOBLÁSTICOS: Coriocarcinoma Tumor trofoblástico del lecho placentario Tumor trofoblástico epiteliode

Tabla 1. Clasificación de enfermedad trofoblástica gestacional de la OMS.

Algunas de estas lesiones son auténticas neoplasias, mientras que otras representan la formación anormal placentaria con predisposición a la transformación neoplásica del trofoblasto. Dos entidades benignas (la reacción exagerada del lecho placentario, y los nódulos del lecho placentario), deben incluirse porque son lesiones trofoblásticas que

deben distinguirse de otras entidades con potencial maligno (Kurman et al., 2012; Shih, 2007).

1.7. Presentación clínica

La mola hidatidiforme completa generalmente era diagnosticada en el segundo trimestre de la gestación, y ciertos síntomas y signos clínicos clásicos eran frecuentes en el momento de la presentación, incluyendo el aumento del tamaño uterino mayor que la edad gestacional, anemia, hiperemesis, hipertiroidismo, hipertensión inducida por la gestación y fallo respiratorio. Sin embargo, la presentación clínica y las características patológicas de la mola completa han cambiado sustancialmente en las últimas dos décadas. En una serie de casos de pacientes entre 1965 y 1975 en el Centro de Enfermedades trofoblásticas de Nueva Inglaterra, con una edad media de gestación de 16,5 semanas, la frecuencia de aumento excesivo del tamaño uterino fue del 51%, hipertensión 27%, hiperemesis 26%, hipertiroidismo 7% y fallo respiratorio 2%. (Soto-Wright, Bernstein, Goldstein, & Berkowitz, 1995).

Con la disponibilidad actual de la determinación de niveles plasmáticos de hCG, y la utilización de la ecografía de forma precoz, el diagnóstico se realiza actualmente durante el primer trimestre, antes de que se desarrollen los signos y síntomas clásicos (Hou, Wan, Xiang, Qi, & Yang, 2008).

La edad gestacional de presentación suele ser entre la semana 6 y la 16 de gestación en el 80-90% de los casos (Lurain, 2010). En una serie de casos diagnosticados entre 1988 y 1993, la edad gestacional media al diagnóstico fue de 11,8 semanas. El aumento del tamaño uterino, anemia, hipertensión e hiperemesis, fueron detectados sólo en un 28%, 5%, 1% y 8% de las pacientes, respectivamente, y ninguna paciente presentó hipertiroidismo o insuficiencia respiratoria (Soto-Wright et al., 1995).

La incidencia de sangrado vaginal, aunque sigue siendo el signo clínico más frecuente como síntoma de presentación, ha disminuido desde el 97% en la serie de casos más tempranos a 84% en las series de casos más tardíos (Berkowitz & Goldstein, 2009a; Lurain, 2010).

El aumento de quistes tecaluteínicos ováricos se produce en el 15% de los casos. Los niveles de hCG son a menudo mayores de 100000 mUI/mL.

Las pacientes con mola parcial no presentan las mismas características clínicas que las que presentan mola completa. Más del 90% de las pacientes, tienen síntomas de un aborto incompleto, incluyendo sangrado vaginal y tamaño uterino que es pequeño o adecuado para la edad gestacional. El diagnóstico se realiza habitualmente tras la revisión histológica de las muestras del legrado.

El principal síntoma es el sangrado vaginal, que sucede en el 75% de las pacientes. El aumento excesivo del tamaño uterino, hiperemesis, hipertensión inducida por la gestación, hipertiroidismo y los quistes tecaluteínicos, se desarrollan de forma infrecuente. Los niveles previos a la evacuación de hCG mayores de 100000 mUI/mL, se detectan en menos del 10% de pacientes con mola parcial (Lurain, 2010).

La neoplasia trofoblástica gestacional (NTG), tiene una presentación variada dependiendo del antecedente de embarazo, la extensión de la enfermedad y la histopatología. La ETG posmolar (mola invasiva o coriocarcinoma), presenta de forma más frecuente un sangrado irregular tras la evacuación de la mola. Los signos que sugieren la NTG posmolar son el aumento irregular del útero, y el aumento ovárico bilateral persistente.

El coriocarcinoma asociado con la gestación no molar no tiene signos ni síntomas característicos, sino los relacionados con la con la invasión del útero o con la localización metastásica. En pacientes con sangrado uterino posparto, la NTG debería ser considerada en los diagnósticos diferenciales. El sangrado como resultado de la perforación uterina o lesiones metastásicas puede provocar dolor abdominal, hemoptisis, melena o puede estar presente la hipertensión intracraneal por hemorragia intracraneal provocando cefalea, convulsiones o hemiplejía. Las pacientes pueden presentar síntomas pulmonares (disnea, tos, dolor torácico) debido a las metástasis pulmonares.

El tumor trofoblástico del lecho placentario y el tumor trofoblástico epiteliode, casi siempre causan sangrado uterino irregular a menudo distanciado de una gestación no molar precedente, y en raras ocasiones virilización o síndrome nefrótico. El útero suele estar simétricamente aumentado de tamaño, y los niveles de hCG, suelen estar ligeramente elevados (Lurain, 2010).

1.8. Diagnóstico de la mola hidatidiforme

1.8.1. Examen ecográfico

La ultrasonografía tiene un papel fundamental en el diagnóstico de la mola hidatidiforme.

Las características ultrasonográficas clásicas de la mola completa en el segundo trimestre, muestran una masa heterogénea intrauterina “en tormenta de nieve”, que es la traducción del edema vellositario con un patrón vesicular, sin desarrollo fetal y con evidencia de los quistes tecaluteínicos ováricos (Seckl et al., 2010) (Figura 23). Aunque algunos investigadores han sugerido que la ecografía puede ser diagnóstica de mola completa en la gestación precoz (Benson et al., 2000), estudios amplios han demostrado que sólo del 40 al 60% de los casos son detectados mediante la ultrasonografía en la práctica clínica habitual (Fowler, Lindsay, Seckl, & Sebire, 2006; Johns, Greenwold, Buckley, & Jauniaux, 2005). Por otra parte, el 10% de casos que parecen ser gestaciones molares ecográficas, son diagnosticadas de abortos no molares en la revisión histológica (Fowler et al., 2006). Las tasas de falsos positivos y falsos negativos son altas con la ecografía, especialmente para la mola parcial, por lo que el examen histológico es esencial para establecer un diagnóstico correcto (Fowler, Lindsay, Seckl, & Sebire, 2007; Seckl et al., 2013).

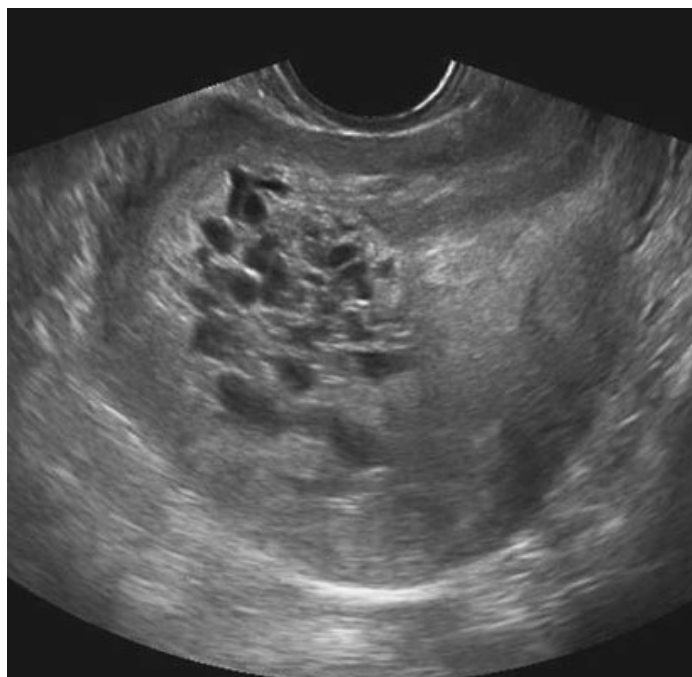


Figura 23. Examen ecográfico de gestación molar completa del primer trimestre. Cambios difusos vesiculares. El saco embrionario está ausente. (Imagen tomada de Berkowitz & Goldstein, 2009a).

La mola parcial está también asociada con hallazgos ultrasonográficos característicos que incluyen cambios focales quísticos en la placenta, y un cociente entre el diámetro transversal y el anteroposterior del saco embrionario mayor de 1.5, estando este hallazgo relacionado con la triploidía. Cuando ambos hallazgos están presentes, el valor predictivo positivo para el diagnóstico de la mola hidatidiforme parcial, se aproxima al 90% (Berkowitz & Goldstein, 2009a, 2009b). La ecografía puede demostrar la presencia de un feto de crecimiento retardado con múltiples anomalías congénitas asociadas a una placenta con hidrops focal.

1.8.2. Determinación de hCG

La hCG es el marcador más específico de ETG, producido tanto por las molas hidatidiformes como por las neoplasias trofoblásticas gestacionales.

La hCG es una glicoproteína compuesta por dos cadenas polipeptídicas, una subunidad α (compartida con otras hormonas glicoproteicas) y una subunidad β , que es la que le confiere la especificidad y la función biológica. Existen distintas formas moleculares de hCG y moléculas relacionadas a hCG, con distinto peso molecular.

Es producida principalmente por el sincitiotrofoblasto y casi invariablemente detectable en suero si está presente el tejido trofoblástico. Las células del trofoblasto intermedio del sitio de implantación también pueden producir la variante de hCG hiperglicosilada que inhibe la apoptosis en las células del trofoblasto intermedio, mientras promueve la invasión celular y el crecimiento y la malignización. Esta variante es un factor autocrino, que actúa en las células invasivas del trofoblasto intermedio, para iniciar y controlar la invasión en el sitio de implantación, el establecimiento de la placentación hemocorial, y la malignización de la mola hidatidiforme y del coriocarcinoma. En general, la forma hiperglicosilada de la hCG, está mínimamente elevada en gestaciones molares, por lo que su aumento, indica mola invasiva o desarrollo o avance de coriocarcinoma (Cole, 2009). Por tanto, esta forma se presenta como un marcador que puede detectar el coriocarcinoma o la NTG activa (Cole et al., 2006; Seckl et al., 2010).

En la gestación normal los niveles de hCG medidos mediante radioinmunoensayo, alcanzan valores de 50.000-100.000 mUI/mL a las 10 semanas de gestación y disminuyen hasta 10.000-20.000 mUI/mL en la semana 20, manteniéndose estos niveles estables

hasta el término de la gestación. Al principio de la gestación los picos de hCG pueden alcanzar valores de hasta 600.000 mUI/mL.

En las gestaciones molares los niveles de hCG al diagnóstico pueden ser variables, pero la mayoría muestran un título marcadamente elevado, lo que es una característica útil para el diagnóstico. Han sido documentados niveles mayores de 2 millones de mUI/mL. Los títulos son generalmente más elevados en las molas completas que en las molas parciales, puesto que las molas parciales están caracterizadas por menor hiperplasia trofoblástica. Fueron determinados niveles previos a la evacuación de las molas, por encima de 100.000 mUI/mL en el 46% de las molas completas seguidas en el Centro de enfermedad trofoblástica de Nueva Inglaterra (Berkowitz & Goldstein, 2009a; D. R. Genest et al., 1991), mientras que en revisiones de series de casos de molas parciales, menos del 10% de las pacientes, presentaron niveles de hCG por encima de 100.000 mUI/mL (Berkowitz & Goldstein, 2009a; Berkowitz, Goldstein, & Bernstein, 1985; Lurain, 2010).

1.8.3. Inmunohistoquímica

El valor de las técnicas de inmunohistoquímica para mejorar el diagnóstico de la mola hidatidiforme, ha sido demostrado en estudios recientes (Bifulco et al., 2008; Maggiori & Peres, 2007; McConnell, Murphy, Hafez, Vang, & Ronnett, 2009).

La detección por inmunohistoquímica de la proteína p57, ciclina inhibidora del ciclo celular dependiente de quinasas, resulta útil para el diagnóstico diferencial en los embarazos molares (Buza & Hui, 2014).

El gen p57 se encuentra localizado en el cromosoma 11p15.5. Este gen es producto de impronta paterna, por lo que su expresión normal es monoalélica materna, es decir, la expresión preferencial se produce a partir de los alelos maternos, y los genes son silentes en las molas hidatidiformes completas androgenéticas (Buza & Hui, 2014; Ronnett, DeScipio, & Murphy, 2011).

Las molas completas pueden distinguirse de las molas parciales y de los abortos no molares, por la valoración mediante inmunohistoquímica de la expresión del gen p57. Las molas completas, que están caracterizadas por diploidía androgenética con pérdida de ADN materno, tienen ausencia de expresión de p57 en las células estromales vellositarias y en el citotrofoblasto (la expresión está conservada en el trofoblasto intermedio intervelloso y las células endoteliales vellositarias). En todas las gestaciones que contienen

material genético materno (molos parciales, abortos hidrópicos no molares, placentas normales o trisomías), sí existe expresión de p57 en los núcleos celulares del citotrofoblasto y células estromales de las vellosidades coriónicas, el trofoblasto intermedio y las islas trofoblásticas intervellositarias. Las células de sincitiotrofoblasto son negativas y el tejido decidual es siempre positivo, y resulta útil como control interno (Buza & Hui, 2014; McConnell et al., 2009; Ronnett et al., 2011) (Figura 24).

Esta diferencia de expresión entre es útil para distinguir la mola completa (incluyendo las formas precoces), de las molas parciales y de los especímenes no molares. Pero estas dos últimas entidades, no pueden ser distinguidas porque comparten patrón de expresión de p57 (Buza & Hui, 2014; McConnell et al., 2009)

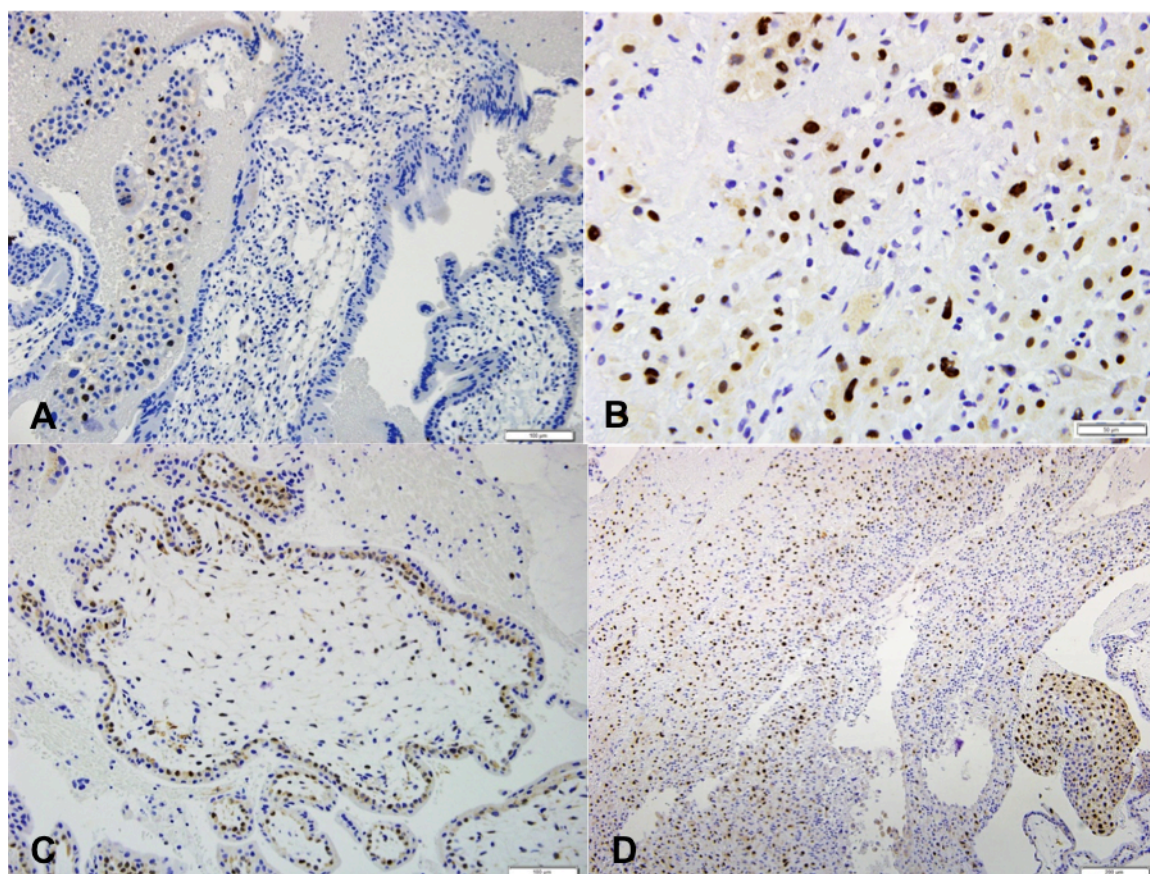


Figura 24. Secciones tisulares representativas sometidas a tinción de inmunohistoquímica para proteína p57. **A. y B.** Mola hidatidiforme completa. **A.** Ausencia de expresión de proteína p57 a nivel nuclear en el citotrofoblasto y en las células estromales vellositarias. Expresión de proteína p57 en trofoblasto intermedio (20X). **B.** Expresión de proteína p57 en células deciduales (40X). **C. y D.** Mola hidatidiforme parcial. **C.** Expresión nuclear de proteína p57 en células del citotrofoblasto y en células estromales de vellosidad (20X). **D.** Expresión de proteína p57 en células deciduales y trofoblasto intermedio (10X). (Imágenes reconstruidas de las muestras obtenidas del Biobanco del Sistema Público de Andalucía, a través del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Virgen del Rocío).

1.8.4. Genotipo molecular

Las características genéticas específicas de las molas completas, parciales y especímenes no molares, pueden ser explotadas para mejorar el diagnóstico de las molas hidatidiformes. Las molas completas son a menudo diploides con ambos complementos cromosómicos de origen paterno (diploidía androgenética), mientras que las molas parciales son triploides con un único complemento cromosómico materno y dos complementos cromosómicos paternos (triploidía diándrica). Los especímenes no molares, son típicamente diploides con un complemento cromosómico paterno y uno materno (diploidía biparental). Algunos especímenes no molares pueden ser triploides debido a dos complementos maternos y uno paterno (triploidía digínica)

Una gran variedad de técnicas moleculares han sido utilizadas para mejorar el diagnóstico de la mola hidatidiforme. Estas técnicas incluyen el análisis citogenético (cariotipo), la determinación de la ploidía mediante la citometría de flujo (Lage & Popek, 1993), la hibridación fluorescente in situ (FISH) (Yver, Carles, Bloch, Bioulac-Sage, & Martin Negrier, 2004), y la amplificación por PCR de secuencias cortas repetidas en tándem o short tandem repeat (STR), conocidos como microsatélites (McConnell et al., 2009; K. M. Murphy, McConnell, Hafez, Vang, & Ronnett, 2009; Ronnett et al., 2011).

Las técnicas empleadas para el análisis de la ploidía (cariotipo, citometría de flujo y FISH), pueden ser realizadas en tejido fresco, congelado o incluido en parafina. Presentan limitaciones dado que no pueden discernir específicamente la contribución cromosómica materna y paterna. Pueden identificar de forma suficientemente segura, los especímenes diploides y triploides y distinguir las molas completas de las parciales, pero no pueden diferenciar las molas completas de los especímenes no molares, ni las molas parciales de los especímenes no molares triploides digínicos (Chen, Hsu, Chen, Ng, & Chen, 2014; McConnell et al., 2009; Ronnett et al., 2011).

En contraste con las técnicas anteriores, la amplificación por PCR de STR, permite discriminar la diploidía androgenética, la triploidía diándrica, la diploidía biparental y diagnosticar las molas completas, parciales y los especímenes no molares repectivamente. Este análisis es particularmente importante para el diagnóstico de las molas parciales (triploidías diándricas), que a veces son difíciles de distinguir de las triploidías digínicas no molares, debido a sus patrones compartidos de expresión de p57 (Buza & Hui, 2014;

McConnell et al., 2009; K. M. Murphy et al., 2009; Ronnett et al., 2011). El genotipo de STR se realiza de ADN extraído de tejidos fijados en formol e incluidos en parafina y requiere muestras maternas y paternas además del tejido molar.

Comparando el número de STR de cada locus específico, pueden compararse los perfiles alélicos de los tejidos maternos y vellositarios en el diagnóstico de las molas hidatidiformes.

Para el análisis de las molas hidatidiformes, los alelos de cada locus son identificados para los tejidos maternos (decidua) y de las vellosidades, comparándose los patrones. Los alelos de las vellosidades se identifican como paternos. El número de copias de cada alelo relativo al otro, puede ser determinado calculando la ratio alélica. Cuando dos alelos están presentes en igual dosis, la ratio será 1:1. Cuando un alelo está en dosis doble comparado con el otro (en trisomías o triploidías), la ratio será 2:1.(Buza & Hui, 2014; K. M. Murphy et al., 2009; Ronnett et al., 2011).

El perfil genotípico de una mola completa, contiene exclusivamente alelos paternos de patrón homocigoto o heterocigoto en al menos dos locus de STR. Las molas parciales monoespérmicas, muestran un alelo materno y una cantidad duplicada de alelo paterno para cada locus de STR, mientras que en las molas parciales dispérmicas, hay dos alelos paternos adicionados a un alelo materno en al menos dos locus (Buza & Hui, 2014).

1.9. Tratamiento y seguimiento de la mola hidatidiforme

1.9.1. Tratamiento

Una vez sospechado el diagnóstico de gestación molar mediante la historia, la exploración física, los niveles plasmáticos de hCG, y los hallazgos ecográficos, debería evaluarse en las pacientes la presencia de complicaciones médicas mediante una evaluación hematológica, renal, hepática y tiroidea. Es necesaria también la evaluación neurológica, el fondo de ojo, la tensión arterial y la valoración radiológica del tórax (Ngan et al., 2012).

Tras la evaluación completa de la paciente, el método de elección para la evacuación, es el legrado por aspiración de la cavidad uterina pacientes que quieren mantener su fertilidad, seguido del legrado intrauterino instrumental para confirmar la evacuación completa del tejido trofoblástico. Se recomienda la perfusión intravenosa de oxitocina al inicio de la aspiración y continuar varias horas en el postoperatorio para mejorar la

contractilidad uterina (Lurain, 2010; Mangili et al., 2014; Ngan et al., 2012; Seckl et al., 2013).

El riesgo de sangrado aumenta con el tamaño uterino, por lo que debería tenerse disponibilidad inmediata de transfusión sobre todo si el tamaño uterino es mayor de 16 semanas.

El riesgo de embolización pulmonar también aumenta en las gestaciones molares mayores de 16 semanas, por lo que deberían ser realizadas las evacuaciones en un centro especializado (Mangili et al., 2014; Ngan et al., 2012).

Las pacientes que son Rh negativo deben recibir inmunoglobulina anti D en el momento de la evacuación uterina, porque el trofoblasto expresa factor Rh (Lurain, 2010; Seckl et al., 2013).

La histerectomía es una alternativa al legrado por aspiración en pacientes sin deseo de fertilidad futuro pues elimina el riesgo de invasión local del miometrio en la enfermedad persistente, aunque no elimina el riesgo potencial de enfermedad metastásica incluso después de la histerectomía. El riesgo de NTG posmolar oscila entre el 15-20% tras la mola hidatidiforme completa y el 0,5-1% tras la mola hidatidiforme parcial (Mangili et al., 2014; Seckl et al., 2013). Por ello serán necesarios controles continuados de hCG (Lurain, 2010; Mangili et al., 2014).

La administración profiláctica de metotrexate y actinomicina inmediatamente tras la evacuación de la mola hidatidiforme, está asociada a una reducción de la incidencia de NTG del 15-20% al 3-8% (Berkowitz & Goldstein, 2009a). Pero su uso es controvertido, porque expondría a más del 80% de las pacientes a una toxicidad innecesaria y no elimina la necesidad de seguimiento de las pacientes, pudiendo inducir resistencia a las drogas (Fu et al., 2012). El uso de quimioterapia profiláctica debería estar limitado a situaciones especiales en las que haya un riesgo de NTG alto o no sea posible un seguimiento de los niveles de hCG (Mangili et al., 2014; Ngan et al., 2012).

1.9.2. Seguimiento

El seguimiento tras la evacuación es esencial para detectar secuelas trofoblásticas (mola invasiva o coriocarcinoma). Se requieren determinaciones seriadas de hCG cada semana o cada dos semanas hasta que la paciente presente al menos, dos determinaciones consecutivas de niveles indetectables de hCG (según la Federación

internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) (Ngan et al., 2012) y la Sociedad Internacional para el estudio de la enfermedad trofoblástica (ISSTD) (Mangili et al., 2014)), o tres determinaciones según otros autores (Berkowitz & Goldstein, 2009a; Lurain, 2010). A partir de ese momento, se realizarán determinaciones mensuales durante 6 meses, y cada 2 meses durante 6 meses más para asegurar que los niveles permanecen indetectables (según la FIGO (Ngan et al., 2012)). La ISSTD propone seguimiento mensual 6 meses después de la normalización de los niveles de hCG (Mangili et al., 2014). En la reunión de la ISSTD de 2013, se propuso que las pacientes con molas parciales, podrían dejar de controlarse los niveles de hCG tras la normalización de dos valores consecutivos, dado que el riesgo de NTG es menor de 1:300 (Mangili et al., 2014). Una vez que se produce el descenso de hCG a niveles indetectables, la elevación recurrente de los niveles, se produce en menos del 1% de las pacientes (Berkowitz & Goldstein, 2009a).

Durante el seguimiento, las pacientes deberían utilizar contracepción durante 6 meses, con el fin de distinguir el aumento de hCG por una enfermedad persistente o recurrente de un aumento provocado por una gestación. Los contraceptivos orales no aumentan el riesgo de NTG (Berkowitz & Goldstein, 2009a; Deicas, Miller, Rademaker, & Lurain, 1991)

Los niveles de hCG, deberían ser monitorizados de 6 a 10 semanas tras cada nueva gestación, para asegurarse de que no se ha reactivado la enfermedad molar previa (Seckl et al., 2010) .

El riesgo de desarrollar una enfermedad persistente tras la evacuación de la mola completa, aumenta con la evidencia de un crecimiento trofoblástico marcado, niveles previos a la evacuación >100000 mUI/mL, crecimiento uterino excesivo (correspondiente a un tamaño de más de 20 semanas de edad gestacional), y quistes tecaluteínicos de más de 6 cm de diámetro. Las pacientes con más de uno de estos signos, tienen aproximadamente un 40% de incidencia de NTG comparado con las pacientes sin ninguno de estos signos (Berkowitz & Goldstein, 2009a).

1.10. Neoplasia trofoblástica gestacional (NTG)

1.10.1. Diagnóstico, clasificación y estadiaje

La NTG, se desarrolla tras las gestaciones molares (60%), los abortos espontáneos (30%) y las gestaciones normales o ectópicas (10%).

La forma de presentación más típica se produce tras una gestación molar que presenta un título de hCG persistentemente elevada junto con un sangrado persistente tras la evacuación de la mola y síntomas secundarios a las metástasis craneales o pulmonares.

Los criterios para el diagnóstico de NTG, definidos por la FIGO en 2000, incluyen uno de los siguientes (Committee, 2002; Ngan et al., 2003) :

1. Ascenso de hCG (definido como un incremento de más del 10% con respecto al valor previo), en al menos 3 valores consecutivos en un período de al menos 2 semanas (días 0,7 y 14).

2. Plateau o meseta de la hCG (definido como un cambio de menos del 10% del valor previo), en al menos 4 valores consecutivos en un período de al menos 3 semanas (días 0, 7, 14 y 21).

3. Diagnóstico histológico de coriocarcinoma.

4. Persistencia de hCG más de 6 meses tras la evacuación de la mola, incluso a pesar de su descenso.

En los últimos informes de la FIGO, los criterios diagnósticos de NTG se refieren a los tres primeros criterios junto con el diagnóstico de metástasis pulmonares mediante radiografía de tórax (Ngan et al., 2012). El último criterio, ha sido cuestionado por nuevos estudios, en los que pacientes con concentraciones que siguen en descenso 6 meses después de la evacuación de la mola hidatidiforme (en valores por debajo de 887 mUI/mL), tienen en la mayoría de los casos, normalización espontánea de los valores sin quimioterapia (Agarwal et al., 2012; Seckl et al., 2013).

En otras instituciones, otros criterios para el inicio de quimioterapia incluirían la evidencia de metástasis inexplicadas (cerebrales, hepáticas u opacidades radiológicas mayores de 2 cm en radiografía de tórax) en edad fértil, con valores elevados de hCG, los valores séricos de hCG por encima de 20000 mUI/mL más de cuatro semanas tras la evacuación, y hemorragias abdominales y uterinas que requieran transfusión (Mangili et al., 2014; Seckl et al., 2010; Seckl et al., 2013).

Tras el diagnóstico de NTG, se consensuó la necesidad de realizar estudios de extensión, además de las evaluaciones de función tiroidea, renal, hepática y hematológica:

1. Evaluación radiológica del tórax. La radiografía de tórax es adecuada para el diagnóstico de metástasis pulmonares. La TC de tórax no es necesaria si la radiografía de tórax es normal, dado que las micrometástasis que pueden detectarse en el 40% de las pacientes, no influyen en el resultado clínico (Darby, Jolley, Pennington, & Hancock, 2009). Se debe utilizar la TC de tórax para el conteo del número de metástasis, si se detectan en la radiografía de tórax.

2. TC abdominal para el diagnóstico de metástasis hepáticas, renales o esplénicas.

3. TC craneal o RMN cerebral fundamentalmente si existen metástasis pulmonares.

La clasificación más empleada actualmente para el estadiaje y clasificación de la NTG, es la clasificación anatómica propuesta por la FIGO en el año 2000 (Committee, 2002) que se recoge en la tabla 2:

ESTADÍO	DESCRIPCIÓN
I	Tumor trofoblástico gestacional estrictamente limitado en el cuerpo uterino.
II	Tumor trofoblástico gestacional que se extiende a los anejos o a la vagina, pero limitado a las estructuras genitales.
III	Tumor trofoblástico gestacional que se extiende a los pulmones, con o sin afectación del tracto genital.
IV	Todas las metástasis de otros lugares

Tabla 2. Estadiaje clínico de la FIGO de la neoplasia trofoblástica gestacional

1.10.2. Clasificación pronóstica

En el año 2000, la FIGO aceptó el sistema de puntuación pronóstica de la OMS, basada en los factores pronóstico expuestos por Bagshawe. Este sistema de puntuación evalúa los factores de riesgo con 1, 2 y 4. Los puntos de corte para NTG de bajo riesgo y de alto riesgo, fueron ratificados por el Comité de Oncología Ginecológica de la FIGO en el año 2002. Una puntuación de 6 o menos, se considera una enfermedad que puede ser tratada con un solo agente quimioterápico. Una puntuación de 7 o más, se considera una enfermedad de alto riesgo que requiere una combinación de quimioterapia. Con este sistema de puntuación, desaparecen las neoplasias de riesgo medio (Ngan et al., 2003; Ngan et al., 2012). Este sistema de puntuación queda recogido en la tabla 3.

FACTOR PRONÓSTICO	PUNTUACIÓN			
	0	1	2	3
EDAD (años)	<40	≥40	-	-
ANTECEDENTE GESTACIONAL	Mola	Aborto	Término	-
INTERVALO DESDE EL FINAL DE LA GESTACIÓN AL INICIO DE QUIMIOTERAPIA (meses)	<4	4-6	7-12	>12
hCG (UI/L)	<10 ³	10 ³ -10 ⁴	10 ⁴ -10 ⁵	>10 ⁵
NÚMERO DE METÁSTASIS	0	1-4	5-8	>8
LUGAR DE LAS METÁSTASIS	Pulmón	Bazo, riñón	Tracto gastrointestinal	Cerebro, hígado
TAMAÑO TUMORAL MAYOR	-	3-5 cm	>5 cm	-
QUIMIOTERAPIA PREVIA	-	-	Droga única	Dos o más drogas

Tabla 3. Puntuación pronóstica FIGO 2000.

1.10.3. Tratamiento

Tratamiento de la enfermedad de bajo riesgo

Para las pacientes con diagnóstico de neoplasia no metastásica (estadío I), y la enfermedad metastásica de bajo riesgo (estadío II y III de FIGO con puntuación pronóstica <7), el tratamiento de elección es el metotrexato o la actinomicina en monoterapia, con tasas de supervivencia próximas al 100%, aunque un 10% de las pacientes requerirán quimioterapia con múltiples drogas (Lurain, 2011).

En este grupo de pacientes deben ser administrados de 2 a 3 ciclos de quimioterapia tras la primera determinación de hCG indetectable, lo que supone alrededor de 6 semanas de tratamiento (Seckl et al., 2013).

Tratamiento de la enfermedad de alto riesgo

La enfermedad neoplásica de alto riesgo es definida como estadio I, II, III de FIGO con puntuación pronóstica de FIGO ≥ 7 , o estadio IV de FIGO.

La administración de un solo agente quimioterápico en estos pacientes, conduce a peores resultados. Estas pacientes deben ser sometidas como terapia primaria a EMA-CO (etopósido, metotrexate con leucovorin, actinomicina D, ciclofosfamida y vincristina).

La remisión completa de la NTG conseguida con el EMA-CO puede ser del 91%. Las tasas de supervivencia acumulada a los 5 años oscilan entre el 75 y el 90%, pero la supervivencia a largo plazo es del 27% si existen metástasis hepáticas, del 70% si existen metástasis cerebrales y del 10% si existen ambas metástasis (Seckl et al., 2013).

Las pacientes resistentes al protocolo EMA-CO, se tratarán con protocolos alternativos: EMA-EP (etopósido y cisplatino), o se alternarán otros fármacos (paclitaxel-etopósido (TE), paclitaxel y 5-fluoruracilo o ifosfamida, cisplatino y etoposido (ICE) o bleomicina, etopósido y cisplatino (BEP)).

Las metástasis que no regresan con quimioterapia, podrían ser susceptibles de extirpación quirúrgica, o de radioterapia en el caso de las metástasis cerebrales o hepáticas (Lurain, 2011; Mangili et al., 2014; Ngan et al., 2012).

Tras la normalización de la hCG, se han de realizar 6 semanas de tratamiento de consolidación, lo que equivale a 3 ciclos adicionales de tratamiento. En el caso de enfermedad de mal pronóstico por metástasis hepáticas o cerebrales, debería prolongarse durante 8 semanas (Seckl et al., 2013).

2. LA SUSTANCIA P Y EL RECEPTOR NK1

2.1. Neuronas y neurotransmisores

El sistema nervioso es único en cuanto a la enorme complejidad de procesos de pensamiento y acciones de control que es capaz de realizar. Dentro de este excepcional sistema, la neurona adquiere un papel primordial como unidad funcional básica del sistema nervioso central (SNC). Hoy en día sabemos que el SNC contiene más de cien mil millones de neuronas. Aunque nuestros conocimientos actuales sobre el sistema nervioso en general y el cerebro en particular son el resultado del trabajo colectivo de un gran número de científicos, debemos reconocer la contribución decisiva de los estudios del científico y Premio Nobel español Don Santiago Ramón y Cajal (1852-1934).

Y es que los más de 30 artículos publicados por este científico entre 1888 y 1892, resumidos en su primera revisión sobre la estructura del sistema nervioso (Ramón y Cajal, 1892), establecieron claramente la base de la teoría neuronal. Esta teoría establece los principios fundamentales de la organización y función del sistema nervioso al afirmar que las neuronas son las unidades anatómicas, fisiológicas, genéticas y metabólicas del mismo (Jones, 1994; Sheperd, 1991). Desde el principio para Cajal, las células nerviosas constituían claramente una unidad anatómica y funcional, que se comunicaban entre sí por contacto o contigüidad, no por continuidad (Ramón y Cajal, 1899).

Cajal no sólo apoyó vivamente la teoría neuronal, sino que fue el científico que más datos aportó para su demostración y aceptación por la mayoría de la comunidad científica. En manos de Cajal, el método de Golgi representó la herramienta principal que hizo posible cambiar el curso de la historia de la neurociencia y significó el nacimiento de la neurociencia moderna (J. De Felipe, 2005) (Figura 25).

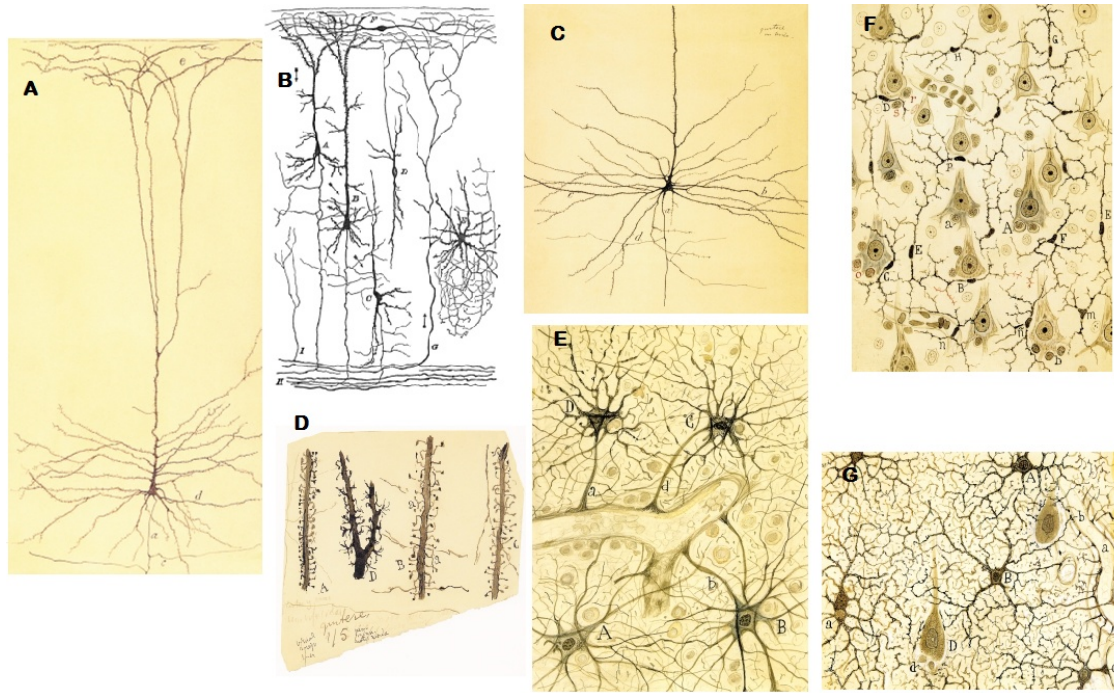


Figura 25. Dibujos realizados por Cajal de diferentes estructuras del SNC. **A.** Células piramidales impregnadas con el método de Golgi (Pirámide gigante profunda de la circunvolución parietal ascendente del niño de treinta días). **B.** Representación esquemática de los tipos principales de neuronas de la corteza cerebral de pequeños mamíferos. **C.** Células piramidales impregnadas con el método de Golgi. (Pirámide gigante profunda de la región motriz del hombre de treinta años). **D.** Diversos tipos de espinas dendríticas de células piramidales (A, conejo; B, niño de 2 meses; C, D, gato). **E.** Astrocitos de la sustancia blanca de la corteza cerebral de un hombre adulto. **F.** Células microgliales de la corteza cerebral de un hombre adulto. **G.** Astrocitos de la sustancia gris de la corteza cerebral de un hombre adulto. (Imágenes modificadas de J. De Felipe, 2005).

La función del SNC depende de las interacciones entre las neuronas en uniones especializadas llamadas sinapsis (Figura 26). El concepto de sinapsis, fue acuñado por Sherrington, en sus estudios sobre el arco reflejo, para definir las zonas de contacto entre las neuronas (Sherrington, 1906).

La comunicación o neurotransmisión de una célula a otra ocurre a través de dos tipos de sinapsis en el SNC: químicas o eléctricas.

Las sinapsis eléctricas son las menos frecuentes en los mamíferos. En estas sinapsis las membranas de las neuronas presinápticas y postsinápticas se encuentran en aposición y se forman uniones intercelulares en hendidura comunicantes a través de los cuales pasan iones libremente, mediando en la transferencia rápida de señales que se propagan por grandes grupos neuronales (Figura 27). La transmisión de las señales en la sinapsis

eléctrica puede ser bidireccional y la transmisión del potencial de acción es más rápido que en la sinapsis químicas y se puede producir de forma sincrónica en un grupo celular.

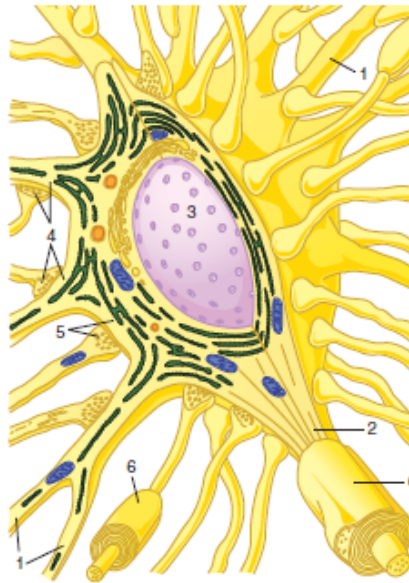


Figura 26. Sinapsis en una neurona motora típica. La neurona tiene dendritas (1), un axón (2) y un núcleo prominente (3). El retículo endoplásmico rugoso se extiende dentro de las dendritas. Muchas neuronas distintas convergen en la neurona, y sus botones terminales forman sinapsis axodendríticas (4) y axosomáticas (5). Vaina de mielina (6). (Imagen tomada de Barrett, Barman, Boitano, & Brooks, 2012, capítulo 6).

Sin embargo, la inmensa mayoría de las sinapsis son químicas. En un terminal axónico aparecen una serie de ramas con unas pequeñas regiones dilatadas llamadas terminales o botones sinápticos. El botón sináptico se apone a una estructura postsináptica adyacente, dendritas o soma, dejando un espacio de 200 a 300 angstroms, denominado hendidura sináptica. Los botones sinápticos contienen orgánulos diversos, entre ellos numerosas mitocondrias, y muestran una conglomeración de vesículas sinápticas esferoidales, que contienen un neurotransmisor químico. Un impulso eléctrico en el axón presináptico induce la secreción del neurotransmisor que difunde a través de la hendidura sináptica, se une a receptores de la neurona postsináptica y modifica la permeabilidad de la membrana para ciertos iones, provocando una respuesta excitadora (secundaria a despolarización celular) o inhibitoria (secundaria a hiperpolarización celular). La transmisión de las señales en la sinapsis química es unidireccional desde el terminal presináptico hasta el soma o la dendrita postsináptica (Figura 28).

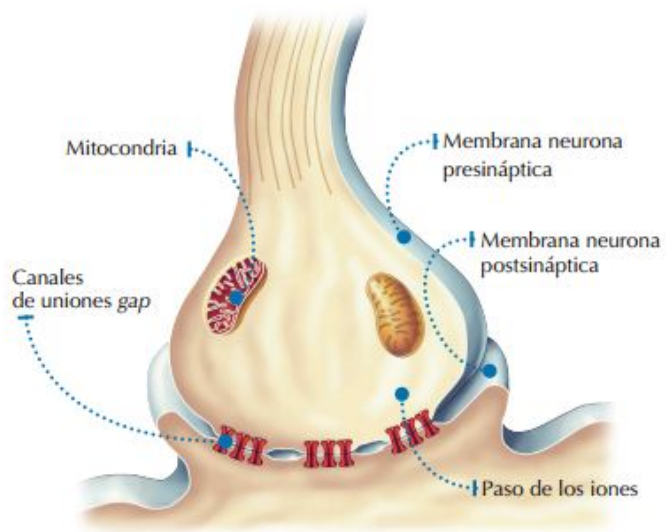


Figura 27. Representación esquemática de una sinapsis eléctrica. (Imagen tomada de Barrett et al., 2012)

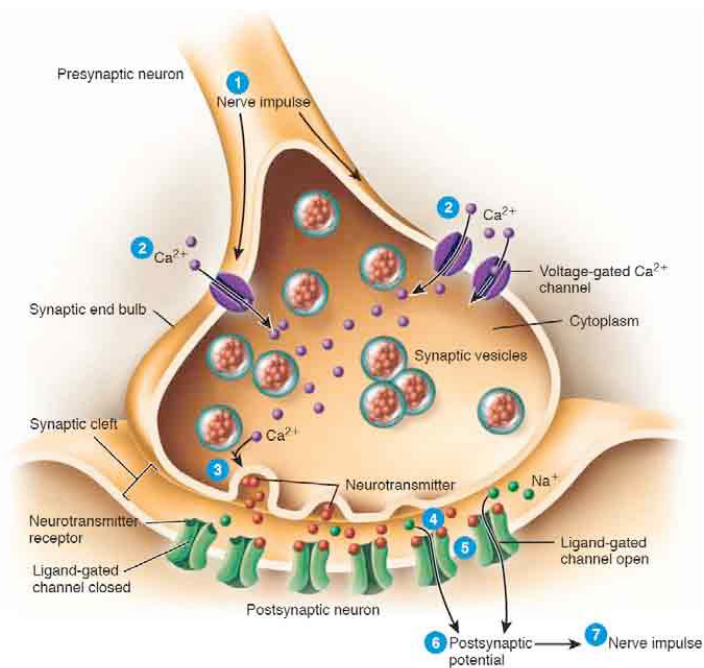


Figura 28. Representación esquemática de una sinapsis química. (Imagen tomada de Tortora & Derrickson, 2013, capítulo 12).

Los primeros experimentos que sugirieron que existía neurotransmisión química fueron realizados en 1904 por T.R. Elliot, quien observó la existencia de una gran similitud entre las acciones que ejercía la aplicación de adrenalina exógena y la estimulación de los nervios adrenérgicos (Elliott, 1904). Propuso entonces, que cuando los nervios simpáticos

se activaban, liberaban adrenalina como un neurotransmisor en sus terminaciones. En 1921 Otto Loewi, proporcionó la primera prueba decisiva de que un mensajero químico era liberado por la inervación vagal del corazón, modificando la frecuencia cardíaca. Con sus experimentos en corazones de sapo, demostró sin lugar a dudas que los impulsos nerviosos, afectaban al corazón por la existencia de un proceso de neurotransmisión química a nivel del sistema nervioso autónomo (Loewi, 1921). Henry Dale descubrió la acetilcolina y sus acciones en 1914 (H. H. Dale, 1914), especulando con la idea de que ésta fuera el neurotransmisor desconocido en los experimentos de Loewi. En 1929 Dale consiguió extraer acetilcolina de mamíferos, y concluyó que la sustancia con efecto parasimpático, era en efecto la acetilcolina (H. H. Dale, Dudley, H.W., 1929).

En la actualidad, se conocen alrededor de 100 sustancias químicas con acción neurotransmisora. Para que una sustancia sea aceptada como neurotransmisor en sentido estricto, ha de cumplir los cuatro criterios siguientes (Ceballos, 1997):

1. Ha de ser sintetizado en la neurona.
2. Ha de estar presente en el terminal nervioso y ser liberado en cantidades necesarias para ejercer su acción sobre la neurona postsináptica u órgano efector.
3. Cuando se aplique exógenamente en concentraciones apropiadas, ha de obtenerse el mismo efecto que se obtiene cuando se libera la sustancia endógena.
4. Ha de existir un mecanismo específico para eliminarlo de su sitio de acción, el espacio sináptico.

Existen diversas clasificaciones de neurotransmisores, atendiendo a distintos criterios. Una de ellas, los divide en: neurotransmisores de molécula pequeña y acción rápida (neurotransmisores clásicos), y neuropéptidos (NP), que son moléculas de gran tamaño y de acción lenta (Tabla 4).

NEUROTRANSMISORES CLÁSICOS, DE MOLÉCULA PEQUEÑA O DE ACCIÓN RÁPIDA	CLASE I	Acetilcolina
	CLASE II: AMINAS	Noradrenalina
		Adrenalina
		Dopamina
		Serotonina
		Histamina
	CLASE III: AMINOÁCIDOS	Ácido γ -aminobutírico (GABA)
		Glicina
		Glutamato
		Aspartato
	CLASE IV	Óxido nítrico (NO)
NEUROPEPTIDOS O NEUROTRANSMISORES DE ACCIÓN LENTA	HORMONAS LIBERADORAS HIPOTALÁMICAS	Hormona liberadora de tiotropina
		Hormona liberadora de hormona luteinizante
		Somatostatina (factor inhibidor de la hormona del crecimiento)
	PÉPTIDOS HIPOFISARIOS	Hormona adrenocorticotropa (ACTH)
		β -endorfina
		Hormona estimuladora de los melanocitos α
		Prolactina
		Hormona luteinizante
		Tirotrópina
		Hormona de crecimiento
		Vasopresina
		Oxitocina
	PÉPTIDOS QUE ACTÚAN SOBRE EL INTESTINO Y EL ENCÉFALO	Leucina-encefalina
		Metionina-encefalina
		Sustancia P
		Gastrina
		Colecistocinina
		Péptido intestinal vasoactivo (VIP)
		Factor de crecimiento nervioso
		Factor neurotrófico derivado del cerebro
		Neurotensina
		Insulina
		Glucagón
	PROCEDENTES DE OTROS TEJIDOS	Angiotensina II
		Bradicinina
		Carnosina
		Péptidos del sueño
		Calcitonina

Tabla 4. Clasificación de los neurotransmisores según el tamaño de la molécula y mecanismo de acción. (Tabla modificada de Hall, 2011, capítulo 45)

Los neurotransmisores de molécula pequeña, se almacenan en vesículas pequeñas cercanas a la membrana, son más accesibles para la liberación de su contenido en la sinapsis y actúan rápidamente causando las respuestas más inmediatas en el SNC, como la transmisión de las señales sensitivas al cerebro o las señales motoras a los músculos.

Los neuropéptidos, se almacenan en vesículas grandes alejadas de la membrana sináptica, habitualmente producen respuestas prolongadas, como cambios a largo plazo en el número de receptores neuronales, y apertura o cierre sostenida de ciertos canales iónicos y posiblemente incluso cambios persistentes en el número de las sinapsis o en su tamaño.

2.2. NEUROPEPTIDOS (NP)

Los NP constituyen el mayor grupo de moléculas distribuidas tanto a nivel del SNC como en la periferia, para la comunicación intercelular como mensajeros hormonales, neurotransmisores y neuromoduladores.

En las bases de datos actuales (Neuroped), están registrados 3455 y 2406 NP en invertebrados y vertebrados respectivamente, pertenecientes a 65 familias neuropeptídicas distintas (Y. Wang et al., 2015).

Los NP tienen un tamaño variable mayor que el de los neurotransmisores clásicos (3-100 aminoácidos) y pueden estar presentes en tejidos y órganos neuronales y no neuronales. Se han localizado tanto en los cuerpos celulares como en las dendritas, y se ha comprobado que su localización es característica de cada uno de ellos, tanto en el SNC como en la periferia.

Los NP desarrollan funciones como neurotransmisores, neuromoduladores amplificando o atenuando la expresión de la actividad neural mediante acciones a nivel pre o postsináptico y/o como neurohormonas, actuando sobre una población de receptores distante tras liberarse desde su punto de síntesis.

2.2.1 Biosíntesis de los neuropéptidos

A partir de trabajos pioneros sobre la insulina y lipotropina (Lazure, Seidah, Pelaprat, & Chretien, 1983) se formuló la hipótesis de que estos péptidos derivaban de un largo precursor que se escindía enzimáticamente. Mediante estudios de secuenciación de

aminoácidos, Schwartz y Costa (J. P. Schwartz & Costa, 1986) descubrieron las denominadas poliproteínas, llamadas así porque sirven de precursor de más de un péptido biológicamente activo. Estas proteínas, también denominados prohormonas, serán fraccionadas por enzimas específicas en fragmentos más pequeños, dando lugar de esta manera a los NP que serán liberados posteriormente (Seidah & Chretien, 1999).

A diferencia de los neurotransmisores clásicos, los NP sólo se producen de novo en los ribosomas del soma neural en forma de prepropéptidos, que incluyen una secuencia señal hidrofóbica en el extremo amino terminal (Strand, 1999). Esta secuencia facilita su translocación a través de la membrana del retículo endoplasmático (RE) del soma y posteriormente al aparato de Golgi. En el RE la proteína precursora del NP sufre una escisión enzimática constituyéndose el propéptido que en el aparato de Golgi es empaquetado en vesículas transmisoras que se liberan hacia el citoplasma, para ser transportadas de forma centrífuga por el axón hacia el extremo de las fibras nerviosas, impulsadas por la corriente axónica del citoplasma, a una velocidad de tan sólo unos centímetros al día. En estas vesículas densas o gránulos secretores se almacenan los propéptidos junto a sus enzimas procesadoras o convertasas, responsables de escindir los propéptidos para dar lugar a sus formas bioactivas (Hokfelt et al., 2000) (Figura 43).

Tras su liberación, la reposición de los NP se produce casi exclusivamente a través de nueva síntesis ribosomal, pues tras la activación neuronal y liberación peptídica, se produce una sobreexpresión de los niveles de ARNm con esta finalidad (Schalling et al., 1987). Tras la liberación de los NP se produce una considerable demora hasta que se reestablecen los niveles previos en las terminaciones nerviosas. Este mecanismo de síntesis que puede parecer menos eficaz, se compensa con un efecto más duradero de los NP (Hokfelt et al., 2000; Schalling et al., 1987).

2.2.2 Sinapsis peptidérgicas

En las sinapsis peptidérgicas, al igual que en las sinapsis del resto de neurotransmisores, se produce una despolarización del terminal presináptico mediante potenciales de alta frecuencia, seguido de la apertura de los canales de Ca^{++} voltaje dependientes, que permite la entrada de este ión al interior de la neurona. Estos iones Ca^{++} promueven la movilización de las vesículas que contienen al NP para fusionarse con la membrana plasmática, liberando al neurotransmisor al espacio sináptico. La liberación de

a través de vías intracelulares que pueden proporcionar una amplificación significativa de su acción. Los NP difunden y se unen al receptor más lentamente que los neurotransmisores clásicos, pero de una forma más estrecha y duradera (Hokfelt et al., 2003).

Por otro lado, los mecanismos de eliminación de los NP, que son la difusión y proteólisis por peptidasas extracelulares sin recaptación presináptica (Akopian, Arzumanian, Agadzhanian, & Arutiunian, 1991), son más lentos que los de los neurotransmisores clásicos (Fuxe et al., 1994), por lo que permanecen accesibles a los receptores más tiempo, contribuyendo a prolongar la duración de sus efectos y a que su metabolismo sea más parecido al de las hormonas que al de los neurotransmisores clásicos. Los NP que ejercen una función neuromoduladora, tendrán un retraso en los mecanismos de degradación en comparación con los que ejercen funciones neurotransmisoras (Garcia-Lopez, Martinez-Martos, Mayas, Carrera, & Ramirez- Exposito, 2002).

Coexistencia y cotransmisión

Un avance que ha cambiado la perspectiva sobre los neuropéptidos y la sinapsis química en general, ha sido el descubrimiento de que los péptidos y los neurotransmisores clásicos pueden coexistir y liberarse conjuntamente (Hokfelt, 1991; Hokfelt, Johansson, Ljungdahl, Lundberg, & Schultzberg, 1980; Hokfelt, Lundberg, et al., 1980; Karhunen, Vilim, Alexeeva, Weiss, & Church, 2001; Lundberg, 1996), siendo habitual en las neuronas adultas la coexistencia de un neurotransmisor de pequeño tamaño y uno o más polipéptidos derivados de una poliproteína. Este concepto supera tanto la hipótesis enunciada por Henry Dale en 1935, que establecía que una neurona era una unidad metabólica y funcionaba en todas las sinapsis con el mismo mecanismo de transmisión química (H. Dale, 1935), como “el principio de Dale” formulado por John Eccles, que interpretaba que cada célula sintetiza un solo neurotransmisor en todos sus terminales (Eccles, 1986).

Del concepto morfológico de coexistencia, surge el concepto funcional de cotransmisión, que implica la regulación de un neurotransmisor de molécula pequeña por otro de naturaleza neuropeptídica. Esta acción se ve favorecida por la lenta degradación y amplia difusión peptídica, lo que permite a los NP controlar grupos neuronales situados a distancia de su lugar de liberación (Björklund, 1992). Esta neuromodulación también la

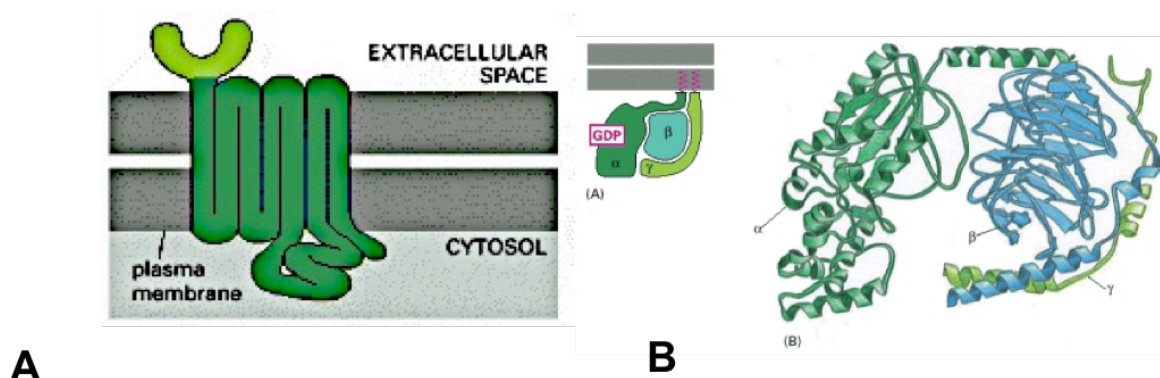
ejercen los NP regulando la liberación de distintos neurotransmisores, ya que en las terminaciones neuronales presinápticas existen receptores de NP (Maneuf, Mitchell, Crossman, & Brotchie, 1994; W. T. O'Connor, Tanganelli, Ungerstedt, & Fuxe, 1992).

Este fenómeno de cotransmisión permitió aclarar fenómenos inexplicables hasta entonces, como era el hecho de que la interacción de un neurotransmisor no peptídico con su receptor en presencia de un NP ejerciera una acción diferente o independiente a la que realiza dicho neurotransmisor de manera aislada sobre el mismo receptor; y es que la acción del NP es la de modular, positiva o negativamente, la acción del no peptídico, interfiriendo en la interacción de éste último sobre su receptor (Hokfelt, Lundberg, et al., 1980; Lundberg et al., 1985).

En la actualidad se conocen numerosos ejemplos de cotransmisión neuronal en diferentes localizaciones. En el asta dorsal de la médula espinal la Sustancia P coexiste tanto con neurotransmisores clásicos (catecolaminas) (Ljungdahl, Hokfelt, & Nilsson, 1978) como con otros neuropéptidos (péptido intestinal vasoactivo, galanina, neurotensina, colecistoquinina) (Radhakrishnan & Henry, 1995).

2.2.3 Receptores de los NP

Es conocido que más del 80% de los receptores de NP, son receptores acoplados a proteína G. Estos receptores que están constituidos por una cadena única de 400 a 600 residuos de aminoácidos, contienen un lugar de reconocimiento para el ligando y un lugar de reconocimiento para una proteína G particular. Estructuralmente presentan siete tramos transmembrana constituidos por 22-28 residuos hidrófobos separados por segmentos hidrófilos. Estos segmentos forman haces de hélices estrechamente empaquetados (Strader, Fong, Tota, Underwood, & Dixon, 1994) (Figura 30).



(Viene de la página anterior) **Figura 30. A.** Estructura de receptor acoplado a proteína G. **B.** Estructura de proteína G inactiva son las subunidades α , β y γ . Las subunidades α y γ están unidas covalentemente a moléculas de lípidos que las anclan a la membrana plasmática. La subunidad α contiene el dominio de GTPasa bloqueado por su unión a la subunidad β en una conformación inactiva, que mantiene su unión a GDP. (Imágenes modificadas de Alberts et al., 2014, capítulo 15).

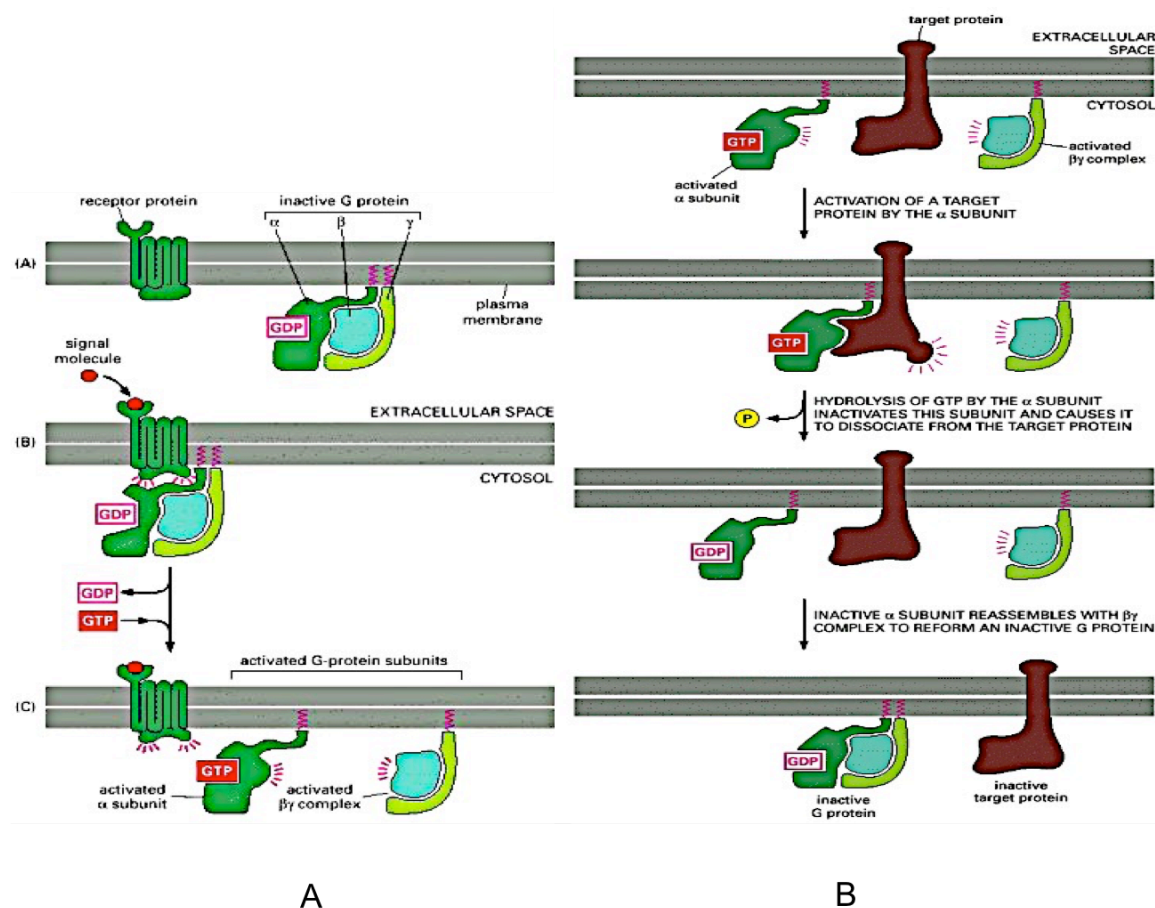


Figura 31. A. Activación de la proteína G. Tras la unión del ligando al receptor, se produce un cambio conformacional en la proteína G. La alteración de la subunidad α , permite el intercambio de GDP por GTP, lo que provoca la disociación de la proteína G en dos componentes activos: la subunidad α y el complejo $\beta\gamma$, que pueden regular la actividad de proteínas diana en la membrana plasmática. **B.** Inactivación de la subunidad α por hidrólisis del GTP a GDP, que se disocia de la proteína diana y se une al complejo $\beta\gamma$, conformando de nuevo una proteína G inactiva (Imagen tomada de Alberts et al., 2014, capítulo 15)

La unión del NP a su receptor provoca la activación de la proteína G, que inicia diferentes vías efectoras de la respuesta intracelular (Figura 31):

1. Activación de la adenilato ciclasa (AC), que convierte ATP en AMPc activando la proteinquinasa A (PKA). La interacción del AMPc con la subunidad reguladora de

la PKA libera la unidad catalítica, que actúa sobre el ADN en el núcleo produciendo efectos sobre el metabolismo, crecimiento y diferenciación celular.

2. Activación de fosfolipasa C- β (PLC- β) que produce hidrólisis del fosfatidil inositol 4,5 bifosfato dando lugar a diacilglicerol (DAG) que activa la proteinquinasa C (PKC), y el inositol trifosfato (IP_3) que aumenta los niveles de calcio citosólicos (Figura 32).
3. También existen receptores de NP acoplados a guanilatociclase o tirosinacinasas.

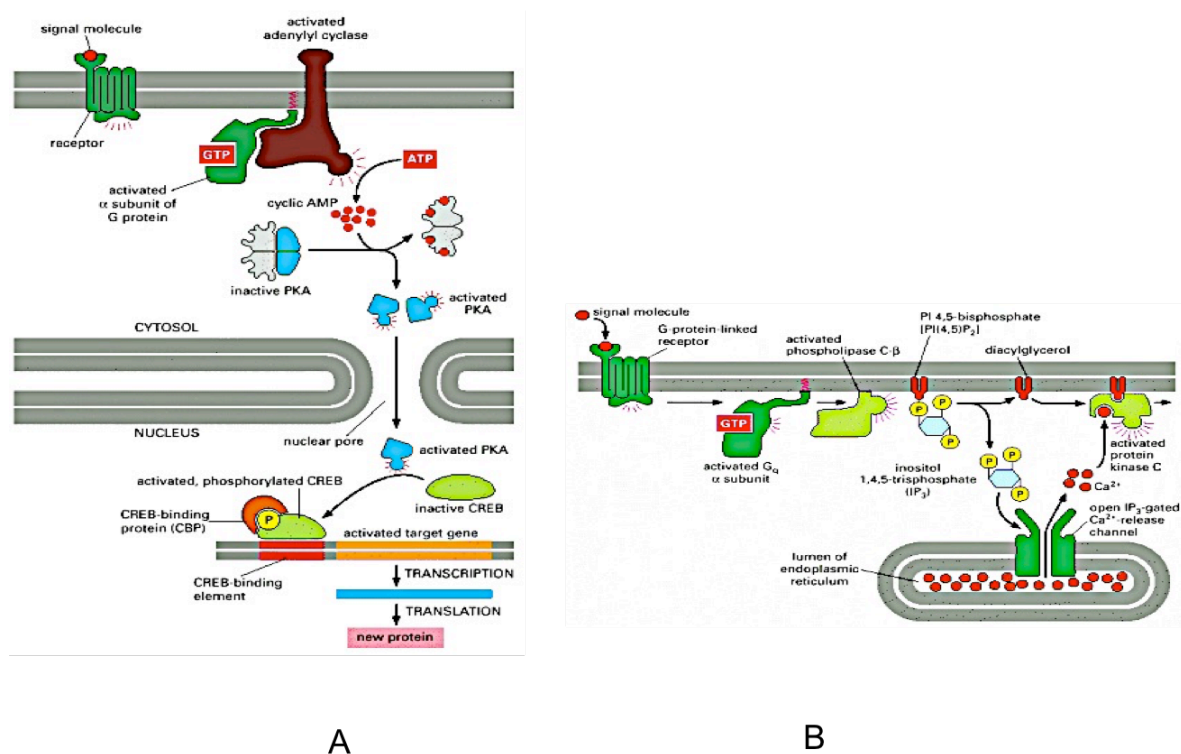


Figura 32. Vías efectoras de los receptores acoplados a proteína G. **A.** Vía de la adenilatociclase y la proteinquinasa A. **B.** Vía del fosfatidil inositol bifosfato. (Alberts et al., 2014)

La identificación de los receptores de los NP ha supuesto un gran avance, pues el hecho de que posean sus propias dianas celulares con sistemas de segundos mensajeros, implica que desempeñen un papel fisiológico propio.

2.2.4 Clasificación de los NP

Se han realizado diversas clasificaciones de los NP que atienden a diferentes criterios, como la localización tisular, la estructura y la secuencia de aminoácidos, lo que ha

permitido dividir a los NP en familias con funciones solapadas o similares de forma clásica (Tabla 5).

<p>HIPOTALÁMICOS</p> <p>Hormona liberadora de tirotropina (TRH)</p> <p>Somatostatina (SS)</p> <p>Hormona liberadora de corticotropina (CRH)</p> <p>Hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH)</p> <p>Hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRH)</p> <p>Orexinas A y B (hipocretinas 1 y 2)</p> <p>HIPOFISARIOS</p> <p>Vasopresina</p> <p>Oxitocina</p> <p>Hormona adrenocorticotropa (ACTH)</p> <p>Hormona estimuladora de melanocitos</p> <p>Prolactina</p> <p>Hormona de crecimiento (GH)</p> <p>Hormona estimulante del folículo (FSH)</p> <p>Hormona luteinizante (LH)</p> <p>Hormona estimulante del tiroides</p> <p>Secretoneurina</p> <p>NP GASTROINTESTINALES Y PANCREÁTICOS</p> <p>Péptido intestinal vasoactivo (VIP)</p> <p>Colecistoquinina (CCK)</p> <p>Gastrina</p> <p>Insulina</p> <p>Glucagón</p> <p>Motilina</p> <p>Amilina</p> <p>Péptido relacionado con el gen de la calcitonina (PRGC)</p> <p>Galanina</p> <p>Secretina</p> <p>Neuropéptido Y</p> <p>Polipéptido pancreático</p> <p>Péptido tirosina-tirosina</p>	<p>NP OPIOIDES</p> <p>Metencefalina (Met-Enk)</p> <p>Leuencefalina (Leu-Enk)</p> <p>Dinorfina</p> <p>β-endorfina</p> <p>TAQUICININAS</p> <p>Sustancia P</p> <p>Neuroquinina A</p> <p>Neuroquinina B</p> <p>Neuropéptido K</p> <p>Neuropéptido γ</p> <p>Hemoquinina 1</p> <p>Endokinina A</p> <p>Endokinina B</p> <p>OTROS</p> <p>Angiotensina II</p> <p>Bombesina</p> <p>Bradicinina</p> <p>Péptido relacionado con el gen de la calcitonina (PRGC)</p> <p>Neurotensina</p> <p>Neuropéptido FF</p> <p>Péptido natriurético cerebral</p> <p>NUEVOS</p> <p>Péptido regulador de la cocaína y anfetaminas</p> <p>Endomorfina 1 y 2</p> <p>Nociceptina/Orfanina</p> <p>Nocistatin</p> <p>Péptido liberador de prolactina</p> <p>Urocortina</p> <p>Cortistatina</p> <p>Apelina</p>
--	---

Tabla 5. Clasificación de los principales péptidos en mamíferos. (Modificado de Garcia-Lopez et al., 2002).

En la actualidad, el número descrito de NP activos ha crecido de forma tan importante que existen bases de datos que agrupan a los NP en familias de genes que comparten estructuras similares o funcionalidad similar. Se han descrito 24 familias de genes que codifican los precursores de los péptidos activos, y en humanos 283 NP distintos en las bases de datos públicas: www.neuropeptides.nl, Uniprot y Neuropep (Y. Wang et al., 2015) y hasta 22 grupos de receptores de NP (Hoyer & Bartfai, 2012).

2.3 Taquicinas

Las proteínas que han sido objeto de estudio de esta tesis doctoral, pertenecen al grupo de las taquicinas (TK).

Las TK constituyen un gran grupo funcional de neurotransmisores presentes en mamíferos, anfibios, moluscos e invertebrados, estando caracterizado por poseer una rápida y potente acción contráctil muscular, contrastando con la actuación lenta de las bradicininas.

Las TK poseen una amplia distribución en el sistema nervioso, tanto a nivel central como periférico donde actúan como neurotransmisores y neuromoduladores. No obstante, también se encuentran distribuidas en otras estructuras no neuronales, actuando como reguladores autocrinos, paracrinos o endocrinos.

Este grupo de proteínas comprende una serie de péptidos relacionados estructuralmente que derivan de un procesamiento alternativo de los tres genes TAC, que interaccionan con tres receptores codificados por tres genes TACR y acoplados a proteína G.

La SP fue el primer miembro de la familia de las TK que fue descubierto en 1931 por von Euler y Gaddum (US & Gaddum, 1931), como una sustancia no identificada en intestino y cerebro de caballo que poseía una actividad contráctil y vasodilatadora en intestino de conejo. Este estudio fue el origen de una larga historia de investigación sobre las TK.

En año 1971 el grupo de Susan Leeman logró purificar SP de intestino de caballo, e identificar por primera vez la secuencia de aminoácidos de una TK de un mamífero (Chang, Leeman, & Niall, 1971).

Desde entonces se han caracterizado e incorporado diferentes péptidos a la familia de las TK: neuroquiniina A (NKA) y neuroquiniina B (NKB) en la médula espinal del cerdo (Kangawa, Minamino, Fukuda, & Matsuo, 1983; Kimura, 1983), el neuropéptido K (NPK) (Nawa, Doteuchi, Igano, Inouye, & Nakanishi, 1984; Tatemoto, Lundberg, Jornvall, & Mutt, 1985) y el neuropéptido γ (NP γ) (Kage, McGregor, Thim, & Conlon, 1988), y la hemoquiniina 1 (HK-1) (Y. Zhang, Lu, Furlonger, Wu, & Paige, 2000). El descubrimiento de la HK-1 dio paso a la descripción de un nuevo grupo de TK, las endoquiniinas. La endoquiniina A y B (EKA y EKB), son formas elongadas de la HK-1 (Kurtz et al., 2002; Page et al., 2003), mientras que la EKC y EKD, tienen una estructura *tachycinin-like* que hace que estos péptidos no presenten afinidad por ninguno de los receptores taquicinérgicos.

En la última década se ha propuesto la inclusión de nuevos péptidos periféricos *tachycinin-like* en esta familia como el péptido-1 similar a las TK del cromosoma 14, (C14TKL-1), expresado en tejidos periféricos y a nivel de SNC, y con actividad agonista equipotencial con SP frente al receptor NK-1 (Jiang et al., 2003). También la virokinina bovina (Zimmer et al., 2003) se considera un péptido *tachycinin-like*, codificada por un gen del virus respiratorio sincitial bovino y secretada por las células infectadas por el virus, con capacidad de infectar e interferir en la función de diferentes tipos de células periféricas, pudiendo inducir respuestas mediadas por los receptores NK1 Y NK3.

Todos estos hallazgos han establecido la estructura común a toda la familia de las TK. La caracterización molecular en la década de los 80 de los genes y receptores de TK, ha permitido aumentar el conocimiento sobre las características bioquímicas y funcionales de las TK.

Las TK y sus receptores, participan en importantes procesos fisiológicos en los sistemas nervioso, inmunológico, gastrointestinal, respiratorio, urogenital y dermatológico incluyendo la inflamación, la nocicepción, la contractilidad del músculo liso, la secreción epitelial y la proliferación. Asimismo, contribuyen a múltiples procesos fisiopatológicos, incluyendo la inflamación y aguda y crónica, el dolor, la fibrosis, los trastornos afectivos y adictivos, alteraciones funcionales del intestino y la vejiga urinaria, la infección y el cáncer.

En la actualidad, el conocimiento de la mediación de las TK en la fisiopatología de múltiples enfermedades, ha provocado el desarrollo de antagonistas de los receptores de TK, como futura terapia farmacológica.

2.3.1 Estructura y genes de las TK

Estructura de las TK

La familia de las TK en los mamíferos está integrada por SP, NKA y NKB, junto con las formas extendidas terminalmente en N de NKA, incluyendo NPK y NP γ , HK-1 y las EK.

TAQUICININA	SECUENCIA de AMINOÁCIDOS ^a
Sustancia P (SP): 11 aminoácidos (Chang et al., 1971)	Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met.NH ₂
Neurokinina A (NKA): 10 aminoácidos (Kimura, 1983; Minamino, Kangawa, Fukuda, & Matsuo, 1984; Nawa, Hirose, Takashima, Inayama, & Nakanishi, 1983)	His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-Met.NH ₂
Neurokinina B (NKB): 10 aminoácidos (Kimura, 1983)	Asp-Met-His-Asp-Phe-Phe-Val-Gly-Leu-Met.NH ₂
Neuropéptido K (NPK): 36 aminoácidos (Tatemoto et al., 1985)	Asp-Ala-Asp-Ser-Ser-Ile-Glu-Lys-Gln-Val-Ala-Leu-Leu-Lys-Ala-Leu-Tyr-Gly-His-Gly-Gln-Ile-Ser-His-Lys-Arg-His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-Met.NH ₂
Neuropéptido γ (NPγ): 21 aminoácidos (Kage et al., 1988)	Asp-Ala-Gly-His-Gly-Gln-Ile-Ser-His-Lys-Arg-His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-Met.NH ₂
Hemokinina-1 (HK-1): 11 aminoácidos (Kurtz et al., 2002)	Thr-Gly-Lys-Ala-Ser-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met.NH ₂
Endokinina A (EKA): 47 aminoácidos (Page et al., 2003)	Asp-Gly-Gly-Glu-Glu-Gln-Thr-Leu-Ser-Thr-Glu-Ala-Glu-Thr-Trp-Val-Ile-Val-Ala-Leu-Glu-Glu-Gly-Ala-Gly-Pro-Ser-Ile-Gln-Leu-Gln-Leu-Gln-Glu-Val-Lys-Thr-Gly-Lys-Ala-Ser-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met.NH ₂
Endokinina B (EKB): 41 aminoácidos (Page et al., 2003)	Asp-Gly-Gly-Glu-Glu-Gln-Thr-Leu-Ser-Thr-Glu-Ala-Glu-Thr-Trp-Glu-Gly-Ala-Gly-Pro-Ser-Ile-Gln-Leu-Gln-Leu-Gln-Glu-Val-Lys-Thr-Gly-Lys-Ala-Ser-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met.NH ₂
PÉPTIDOS RELACIONADOS CON LAS TK <i>(tachykinin-like)</i>	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS
Endokinina C (EKC)^b: 14 aminoácidos (Page et al., 2003)	Lys-Lys-Ala-Tyr-Gln-Leu-Glu-His-Thr-Phe-Gln-Gly-Leu-Leu.NH ₂
Endokinina D (EKD)^b: 14 aminoácidos (Page et al., 2003)	Val-Gly-Ala-Tyr-Gln-Leu-Glu-His-Thr-Phe-Gln-Gly-Leu-Leu.NH ₂
Péptido-1 similar a las TK del cromosoma 14^b: (C14TKL-1): 11 aminoácidos (Jiang et al., 2003)	Arg-His-Arg-Thr-Pro-Met-Phe-Tyr-Gly-Leu-Met.NH ₂
Virokinina bovina^b: 20 aminoácidos (Zimmer et al., 2003)	Gly-Ile-Pro-Glu-Leu-Ile-His-Tyr-Thr-Arg-Asn-Ser-Thr-Lys-Lys-Phe-Tyr-Gly-Leu-Met.NH ₂

Tabla 6. Secuencia de los diferentes NP que integran la familia de las taquicininas de mamíferos.

^aLos aminoácidos subrayados son los que conforman la secuencia C-terminal común de las TK. En negrita se

representa el residuo aromático o alifático correspondiente. En azul, se señalan los residuos comunes a todas las taquicininas. ^bPéptidos relacionados con las TK (*tachykinin-like*) con estructura variante de la forma clásica.

Las TK constituyen una familia de aminopéptidos que comparten una misma secuencia pentapeptídica en el extremo hidrofóbico carboxi-terminal (Phe-X-Gly-Leu-Met-NH₂) (Regoli, Boudon, & Fauchere, 1994) que es esencial pero no suficiente para su actividad biológica. Característicamente todas las TK son aminopéptidos, y presentan un grupo amino en la metionina carboxi-terminal. La secuencia aminoterminal es crucial para la actividad biológica y define la especificidad frente al subtipo del receptor (Schwyzer, 1987), mientras que la secuencia C-terminal es la encargada de la interacción y activación de dicho receptor, a través de la cual ejercerá sus funciones biológicas (Cascieri et al., 1992; Krause, Takeda, & Hershey, 1992; Maggi, 1995), siendo crucial el residuo Phe en posición 5 en la secuencia C-terminal.

En la tabla 6, se recogen las secuencias aminoacídicas de las taquicininas humanas y de los péptidos relacionados con las taquicininas.

Genes de las TK

Las TK de los mamíferos están codificadas por tres genes diferentes denominados TAC1, TAC3 y TAC4, de acuerdo con el Comité de Nomenclatura de Genes de la Organización del Genoma Humano (<http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/>).

El gen TAC1 codifica SP, NKA y sus formas elongadas NPK y NPγ; el gen TAC3 codifica NKB y TAC4, la HK-1 y endokininas (Figura 33).

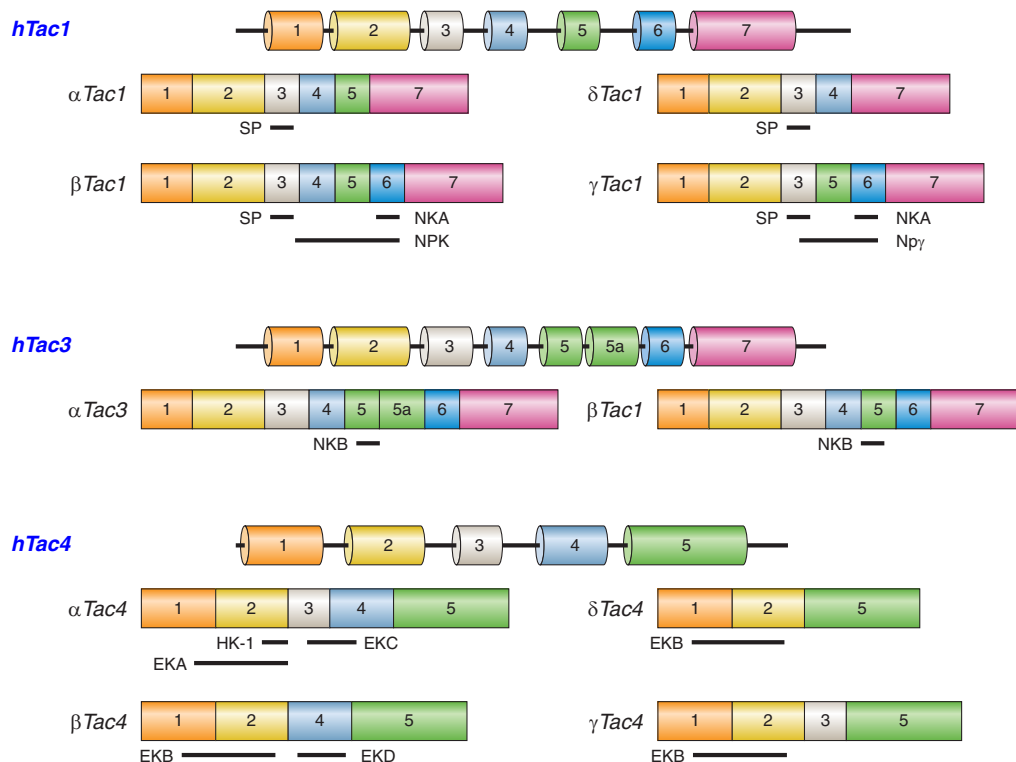


Figura 33. Estructura de los genes TAC humanos y la existencia de isoformas de ARNm. Los productos peptídicos están indicados con las barras negras horizontales bajo las isoformas de ARNm.

2.3.2. Acciones de las TK

Debido a su amplia distribución, las TK participan en diversos procesos fisiopatológicos. Las TK están implicadas en la fisiopatología de distintas enfermedades psiquiátricas como la ansiedad, la depresión y son al menos parcialmente responsables de las respuestas del sistema cardiovascular y del comportamiento al estrés (Black, 2002; Kramer et al., 1998; Massi, Panocka, & de Caro, 2000).

Las neuronas sensitivas primarias inervan la mayoría de los tejidos y pueden liberar TK desde terminaciones centrales y periféricas induciendo la transmisión y la inflamación neurogénica (Bradesi, Eutamene, Garcia-Villar, Fioramonti, & Bueno, 2003; Jancso, Jancso-Gabor, & Szolcsanyi, 1967; Lembeck & Holzer, 1979; Mantyh et al., 1997; Otsuka & Yoshioka, 1993) (Figura 34). Las TK (SP y NKA) tienen un papel fundamental en la transmisión a nivel de la primera sinapsis de las vías nociceptivas dado están presentes en las neuronas que median los estímulos nociceptivos en los estímulos físicos y químicos (fibras tipo C y tipo Aδ).

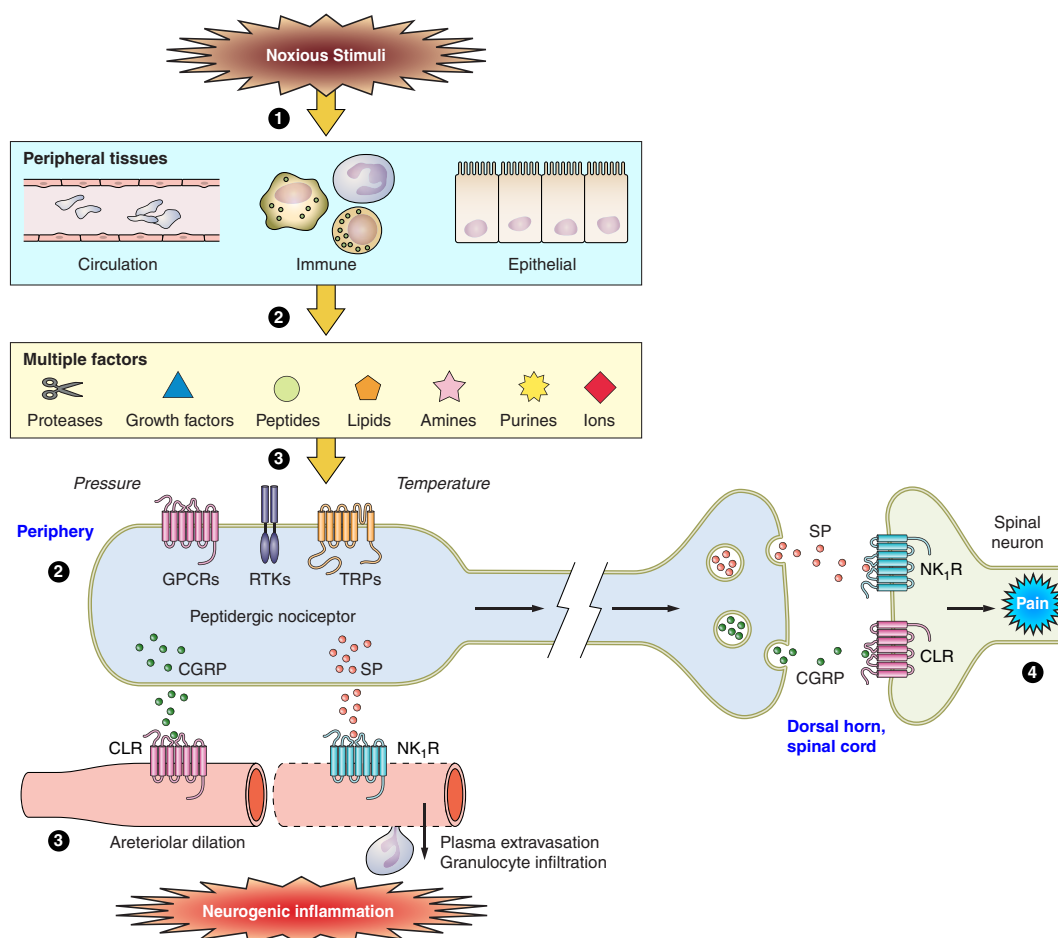


Figura 34. Representación esquemática de la contribución de las TK y los receptores de neuroquininas al dolor y la inflamación neurogénica. 1. El estímulo doloroso a nivel de los tejidos periféricos conduce a la liberación y producción de múltiples factores que provienen de la circulación, las células inmunes y epiteliales. 2. Estos factores (proteasas, factores de crecimiento, péptidos, lípidos, aminas, purinas, iones, presión y temperatura elevada), activan diversos receptores incluyendo los GPCRs. 3. Inflamación neurogénica: Los nociceptores activados liberan NP en los tejidos (SP y NKA), que estimulan los RNK1 en las células endoteliales de las vénulas postcapilares y causan extravasación de plasma e infiltración de granulocitos. PRGC (péptido relacionado con el gen de la calcitonina en inglés, CGPR), estimula el CLR (receptor calcitonina-like) en las arteriolas provocando hiperemia. 4. Si los factores estimulan los nociceptores y generan potenciales de acción, SP y PRGC, se liberan a nivel del asta posterior de la médula espinal, estimulando las neuronas espinales transmitiendo los estímulos dolorosos. (Imagen modificada de Steinhoff, von Mentzer, Geppetti, Pothoulakis, & Bunnett, 2014, p. 278).

Ha sido ampliamente argumentado el papel que la SP y RNK1 desarrollan en la interacción entre los sistemas nervioso e inmune. SP y el RNK1 se expresan en distintos tipos de células del sistema inmunitario y la SP a través del RNK1, estimula y regula sus funciones (Augustyniak et al., 2012; Lambrecht et al., 1999; Lighvani, Huang, Trivedi,

Swanborg, & Hazlett, 2005; Okaya, Holthaus, Kato, & Lentsch, 2004; Pradhan Nabzdyk et al., 2013; Shaik-Dasthagirisahab et al., 2013; Smyth et al., 2013; X. Wang et al., 2006; Yaraee, Ebtekar, Ahmadiani, Sabahi, & Ghazanfari, 2007). Por otro lado, distintas interleuquinas (IL), como la IL-1 β inducen la sobreexpresión de SP y de la expresión del ARNm del RNK1 en las células inmunes e inflamatorias. (Hart, Shadiack, & Jonakait, 1991). La identificación de la HK-1 y el descubrimiento de que es un factor esencial para la supervivencia y maduración de las células pre-B (Y. Zhang et al., 2000) indica una importancia crucial de las TK en la neuroinmunomodulación. Las TK actúan como moléculas de señal endocrina o paracrina que propagan las respuestas inflamatorias y de inmunidad celular, lejos de las células o de las fibras sensitivas donde son liberadas.

Las TK juegan un papel importante en el desarrollo de la hiperreactividad bronquial (Figini et al., 1997), la inflamación (Grant, Akhtar, Gerard, & Brain, 2002) y la tos (Hay et al., 2002) que son los síntomas principales del asma.

Un lugar de localización preferente de TK es el tracto digestivo (Y. Shimizu, Matsuyama, Shiina, Takewaki, & Furness, 2008), sugiriendo una importante participación en los procesos fisiológicos de estos péptidos a este nivel, en relación con la transmisión neuroneuronal (Alex, Kunze, Furness, & Clerc, 2001), la estimulación de la secreción de electrolitos y fluidos del epitelio intestinal, la regulación de la motilidad intestinal (Deiteren, De Winter, Nullens, Pelckmans, & De Man, 2011), la inflamación intestinal (Metwali, Blum, Elliott, Setiawan, & Weinstock, 2004; Weinstock, 2004) y la transmisión del dolor visceral (M. M. Zhang et al., 2013)

Los efectos de las TK en el tracto urinario han sido ampliamente estudiados (Candenas et al., 2005). Las TK estimulan la contracción del músculo liso del uréter (Patacchini et al., 1998) y de la vejiga y tienen efectos proinflamatorios vesicales (Candenas et al., 2005).

Las TK actúan como reguladoras de las funciones en relación con la reproducción. Controlan la secreción de gonadotropinas y prolactina a nivel del eje hipotálamo-hipofisario (Angell & Steiner, 2015; Navarro et al., 2015; Topaloglu & Semple, 2011), regulan la actividad contráctil del miometrio (Cejudo Roman et al., 2012; Patak et al., 2005), y más estrechamente su activación en la gestación (Pennefather et al., 2006). Median reacciones inflamatorias uterinas que pueden conducir al aborto (Fest et al., 2006), contribuyen a la preeclampsia en la gestación (Page, Dakour, & Morrish, 2006; Page

et al., 2000) y en el ovario controlan la secreción esteroidea y estimulan el crecimiento del ovocito (Aoyama et al., 2008).

A nivel del aparato reproductor masculino, pueden aumentar la motilidad de los espermatozoides humanos (Pinto et al., 2010) y potencian la contractilidad de los conductos deferentes, las vesículas seminales, y el tejido eréctil (Candenas et al., 2005).

Muchos tipos de células tumorales expresan receptores de NK y las TK que se originan en las células tumorales, pueden inducir proliferación, apoptosis y metástasis del tumor de forma autocrina, paracrina o neurocrina (Steinhoff et al., 2014).

2.4 Receptores taquicinérgicos

2.4.1. Clasificación, estructura y genes

Los receptores de las TK se han dividido en tres tipos distintos según sus ligandos de mayor afinidad: RNK1, RNK2 y RNK3, quienes presentan una afinidad preferente pero no única por la SP, NKA y NKB respectivamente (Page, 2005; Pennefather et al., 2004).

EL NPK y el NPy, como formas elongadas de la NKA, se unen con preferente a RNK2, aunque también poseen alta afinidad por RNK1 (van Giersbergen, Shatzer, Burcher, & Buck, 1992). Tanto la HK-1 como la EKA y la EKB presentan alta afinidad por el RNK1, (Kurtz et al., 2002; Morteau, Lu, Gerard, & Gerard, 2001; Page et al., 2003; Y. Zhang et al., 2000). Las EKC y EKD, no muestran afinidad por los receptores de TK (Page et al., 2003).

Los tres receptores de TK pertenecen a la familia 1 (*rodopsina like*) de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs, de inglés *G-protein coupled receptors*) (Maggi, 1995; Pennefather et al., 2004) (Figura 35).

Los tres receptores taquicinérgicos, RNK1, RNK2 y RNK3, están codificados por tres genes diferentes, denominados TACR1, TACR2 y TACR3 respectivamente. Estos genes tienen una organización estructural similar y contienen 5 exones codificantes (Gerard et al., 1991; Hershey, Polenzani, Woodward, Miledi, & Krause, 1991).

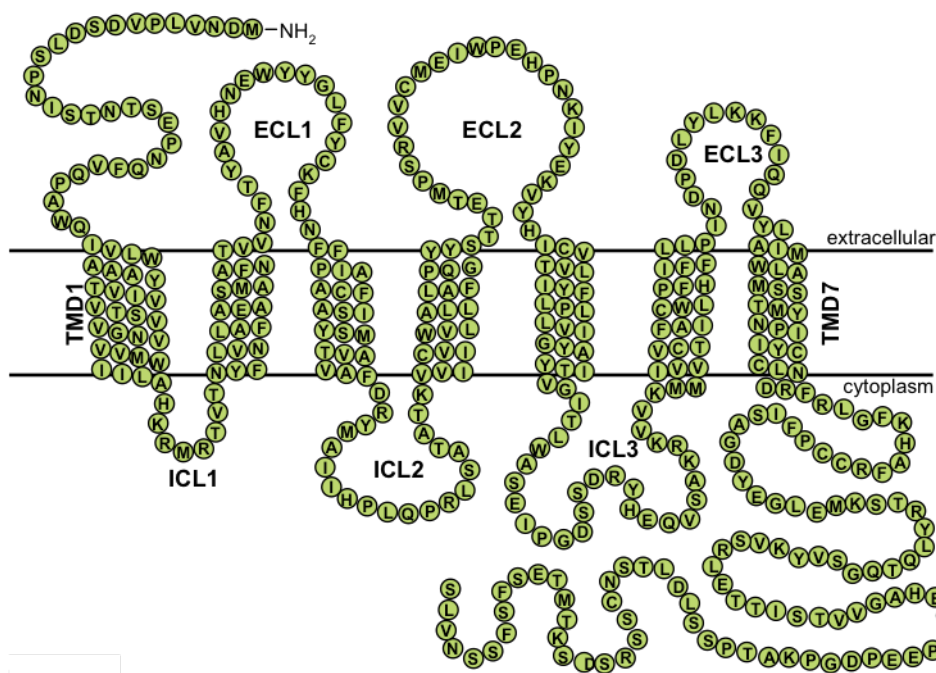


Figura 35. Representación esquemática de la estructura del RNK1 humano. (Imagen modificada de Steinhoff et al., 2014, p. 268).

2.5. Sustancia P (SP)

La SP fue el primer miembro de la familia de las TK que se descubrió, por lo que es la mejor caracterizada en cuanto a su distribución, liberación, acciones fisiológicas e implicación fisiopatológica en diversas enfermedades.

La SP fue inicialmente detectada en un extracto de intestino y de cerebro de caballo. Von Euler y Gaddum encontraron que este componente tenía una potente acción estimuladora de la contractilidad en el yeyuno de conejo y que producía hipotensión, siendo resistente a la acetilcolina (US & Gaddum, 1931). Comprobaron que su actividad se mantenía cuando al evaporarse se convertía en polvo seco, motivo por el que le llamó Sustancia P (P de *powder* en inglés). Se observó que la SP tenía un efecto a nivel periférico, causando una disminución de la presión sanguínea (US & Gaddum, 1931).

Su aislamiento e identificación de su secuencia aminoacídica (undecapéptido), no fue posible hasta comienzos de la década de los 70, cuando Chang y Leeman lo lograron a partir de hipotálamo de cerebro bovino (Chang & Leeman, 1970; Chang et al., 1971). Fueron los primeros en sintetizar la SP (Tregear, Niall, Potts, Leeman, & Chang, 1971) y

pusieron a punto un radioinmunoensayo para la SP (Powell, Leeman, Tregear, Niall, & Potts, 1973).

Como se ha comentado con anterioridad, la SP es un undecapéptido perteneciente a la familia de las TK, codificado por el gen TAC1. La transcripción del gen produce la preprotaquicinina-A (PPTA), que puede dar lugar a una de las cuatro isoformas de PPTA, codificando las isoformas α y δ un prepropéptido que contiene SP y las isoformas β y γ unos prepropéptidos que contienen NKA y NPK, y NKA y NPy, respectivamente (Pennefather et al., 2004).

Tras ser liberada a nivel del terminal presináptico, se inactiva fundamentalmente por peptidasas, no participando en su inactivación la recaptación de este neuropéptido. Las enzimas que se encargan de su inactivación son fundamentalmente la endopeptidasa neutral (NE, del inglés *neutral endopeptidase*: EC3.4.24.11) y la enzima convertidora de angiotensina (ACE, del inglés *angiotensin convertin enzyme* EC.3.4.15.1), y también la enzima degradante de la SP (SPDE del inglés *substance-P-degrading enzyme*: EC.3.4.21), la dipeptidil aminopeptidasa IV (DP-IV: EC.3.4.14.5), la endopeptidasa post-prolina (PEP: EC3.4.21.26), la catepsina-D (EC.3.3.23) y la catepsina-E (EC.3.4.23.34) (Joos, Germonpre, & Pauwels, 2000).

Las acciones biológicas de la SP están mediadas fundamentalmente por el RNK1, siendo la SP el ligando natural con mayor afinidad por este receptor, de los tres descritos hasta ahora. Es el extremo carboxi-terminal el que interacciona y activa al receptor taquicinérgico, mientras que el amino-terminal define la especificidad frente al subtipo de receptor. En el caso de la SP, el hexapéptido (6-11), representa el fragmento mínimo con selectividad y capacidad para activar al RNK1 (Almeida et al., 2004).

La expresión de la SP está ampliamente distribuida por el SNC y periférico, sobretodo a nivel de las neuronas aferentes cuando actúa como neurotransmisor. En el SNC se encuentra expresada en neuronas, astrocitos, microglía y células endoteliales cerebrales. Se localiza en la corteza cerebral en las áreas somatomotora, somatosensorial, visual y olfatoria. Sin embargo a nivel subcortical es donde se hallan los mayores niveles de este péptido: los núcleos caudado y putamen presentan una densidad muy elevada de somas celulares que expresan SP, presentando proyecciones axonales a la sustancia negra, siendo el área negroestriada una de las áreas de mayor concentración del péptido. También se encuentra en los núcleos amigdalinos del hipocampo, cápsula interna y

septum. En el tronco del encéfalo se localiza entre los principales núcleos neuronales destacando el trigémino, y en la médula espinal a nivel de las astas posteriores (Satake & Kawada, 2006). A nivel del sistema nervioso periférico, la SP se localiza en las neuronas sensoriales primarias de los ganglios espinales, cadena cervical simpática y en los ganglios yugular, nodoso del vago y trigeminal (Beaujouan, Torrens, Saffroy, Kemel, & Glowinski, 2004; Sternini, 1991).

En el resto del organismo, la SP está ampliamente distribuida, localizándose alrededor de los vasos sanguíneos o terminaciones nerviosas en la mayoría de órganos y tejidos: piel, folículos pilosos, glándulas sudoríparas, aparato respiratorio, genitourinario y cardiovascular, en los plexos mientérico y submucoso del sistema digestivo e incluso en la pulpa dentaria (Satake & Kawada, 2006; Y. Shimizu et al., 2008; Steinhoff et al., 2014). Se ha descrito la presencia de SP en la placenta, órgano carente de innervación (Marziani et al., 2005; Munoz, Pavon, et al., 2010).

La SP y el RNK1, tienen amplia expresión en las células del sistema inmune (neutrófilos, monocitos y macrófagos, células dendríticas, mastocitos, eosinófilos, linfocitos y natural killers) provocando a través de la activación de la proteína NF- κ B la producción de citoquinas (Bost, 2004; Ho, Lai, Zhu, Uvaydova, & Douglas, 1997; Satake & Kawada, 2006).

2.6. Receptores NK1 (RNK1)

2.6.1. Estructura de RNK1

El RNK1, pertenece a la familia de receptores con 7 dominios transmembrana rodopsina-like clase 1, acoplados al subgrupo Gq11 de proteínas G (GPCR del inglés *G-protein coupled receptors*) (Maggi, 1995). Estos receptores comparten la misma unidad estructural consistente en tres bucles extracelulares (ECL1, ECL2, ECL3), y 3 intracelulares (C1, C2 y C3), con la posibilidad de un cuarto debido a la palmitoilación de una cisteína (Cys), flanqueados por 7 dominios transmembrana, un extremo amino-terminal extracelular y otro carboxi-terminal citoplasmático (Maggi, 1995; Pennefather et al., 2004). El núcleo lo conforma el haz de siete α -hélices transmembrana contraídas y estabilizadas como resultado de sus mutuas interacciones electrostáticas e hidrofóbicas y una red de enlaces en este entorno lipofílico. Los bucles extracelulares se organizan en cuatro filamentos de hoja plegada- β , mientras que los intracelulares carecen de estructura

determinada (Okada & Palczewski, 2001; Stenkamp, Filipek, Driessen, Teller, & Palczewski, 2002).

La región pentapeptídica carboxi-terminal interacciona con los receptores de TK activando una o más proteínas G, mientras que la secuencia aminoterminal, es la responsable de la especificidad frente al receptor. El tercer bucle citoplasmático es el responsable de la unión a proteínas G. El extremo carboxi-terminal contiene residuos de serina/treonina que cuando son fosforilados, causan la desensibilización del receptor una vez es activado repetidas veces por el agonista (T. M. O'Connor et al., 2004).

Tras la unión al ligando, la traducción de la señal se lleva a cabo mediante una reordenación del haz de α -hélices que induce un cambio de conformación en la superficie citoplasmática del receptor que es transmitido a la proteína G para que complete el mecanismo de señal (Ernst & Bartl, 2002).

Los hallazgos de diferentes trabajos defienden que el RNK1 responde a un modelo de activación multimodal, en el que la unión de cada ligando induce en el receptor una conformación única estable y específica que le permite activar una o más proteínas G de una manera ligando-específica (Lecat, Bucher, Mely, & Galzi, 2002; Palanche et al., 2001). Esta conformación adoptada por el receptor estaría condicionada tanto por el ligando (Hastrup & Schwartz, 1996) como por el microambiente, es decir, el medio extracelular y la composición fosfolipídica de la membrana en la proximidad del receptor (Villar et al., 1998). Se ha demostrado la existencia de diferentes conformaciones activas tanto en el RNK1 como en el RNK2, presentando cada una de ellas una forma preferencial para activar cada uno de los diferentes mecanismos efectores además de una afinidad diferente por los distintos agonistas y antagonistas (Hastrup & Schwartz, 1996; Lecat et al., 2002; Maggi & Schwartz, 1997; Palanche et al., 2001).

El ligando preferente del RNK1 es la SP, aunque existen otros ligando de alta afinidad, como las hemokinas y las endokinas. La NKA y NKB, también se unen al RNK1 (Hastrup & Schwartz, 1996; Maggi, 2000).

En los últimos años numerosos estudios han tenido como objeto identificar las regiones del RNK1 implicadas en la unión de los ligandos. Como resultado de numerosos trabajos se cree que dado el carácter hidrofílico de la SP, esta unión se produce a nivel de múltiples dominios de la cara extracelular del receptor (Figura 51). En este sitio de unión ejercen un papel destacado algunos aminoácidos de los bucles extracelulares (como el

Asn96 y Met 181, del primer y segundo bucle, respectivamente), las hélices transmembrana (His108 y Tyr287, de la III y VII hélice, respectivamente) y el extremo N-terminal los residuos 23-25 son fundamentales para la unión de la SP (Asn23, Gln24 y Phe 25) (Fong, Yu, & Strader, 1992; Gether, Johansen, & Schwartz, 1993; R. R. Huang, Yu, Strader, & Fong, 1994; Kage, Leeman, Krause, Costello, & Boyd, 1996), aunque otros estudios identifican hasta 12 residuos necesarios a nivel del extremo N-terminal en las posiciones 11-21 y a nivel del segundo bucle extracelular Glu-172 and Ile-182 para la unión a SP (Valentin-Hansen et al., 2014), proponiendo un modelo estructural de RNK1 en su unión a SP. Los antagonistas no peptídicos, por su naturaleza hidrófoba, tienen su lugar de unión al RNK1 localizado más profundamente, entre los segmentos transmembrana, a diferencia de la SP (Figura 36) (Gether, Johansen, Snider, et al., 1993).

De esta manera, la unión de la SP al RNK1 estabiliza una serie de conformaciones activas de este receptor que serán reconocidas por la proteína G específica (Holst, Zoffmann, Elling, Hjorth, & Schwartz, 1998). En este aspecto, se conoce que algunos aminoácidos como Phe268, Glu78 o Tyr205 ejercen un papel importante en la estabilización de esa conformación activa o en la activación del mecanismo de señal. Merece la pena destacar el papel de Gly166 y Tyr216, residuos de las hélices transmembrana IV y V, respectivamente, que también se relacionan con el mantenimiento de la conformación correcta del RNK1 de cara a la selectividad del mismo por la SP. Así, mutaciones que afectan a estos dos aminoácidos aumentan la afinidad de RNK1 por diferentes ligandos como NKA, NKB y septide (Ciucci, Palma, Manzini, & Werge, 1998; Kage et al., 1996).

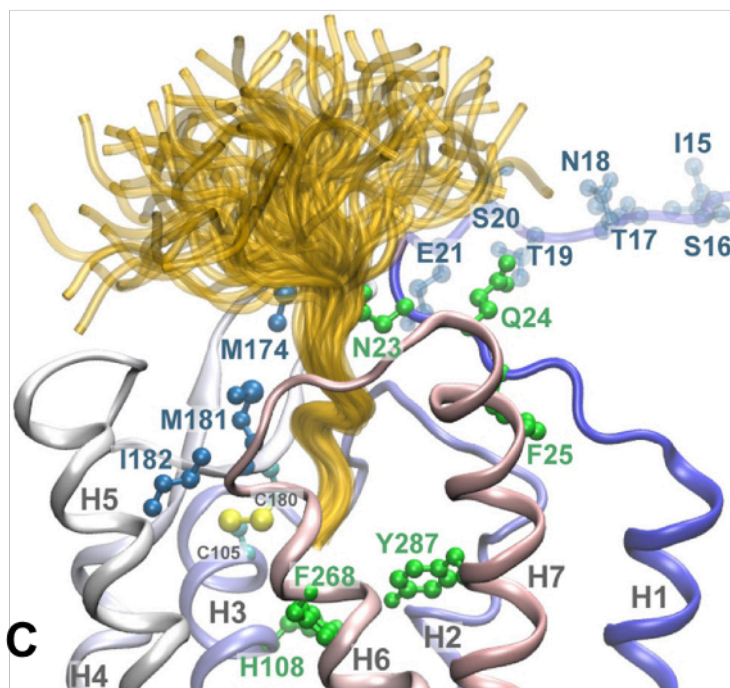
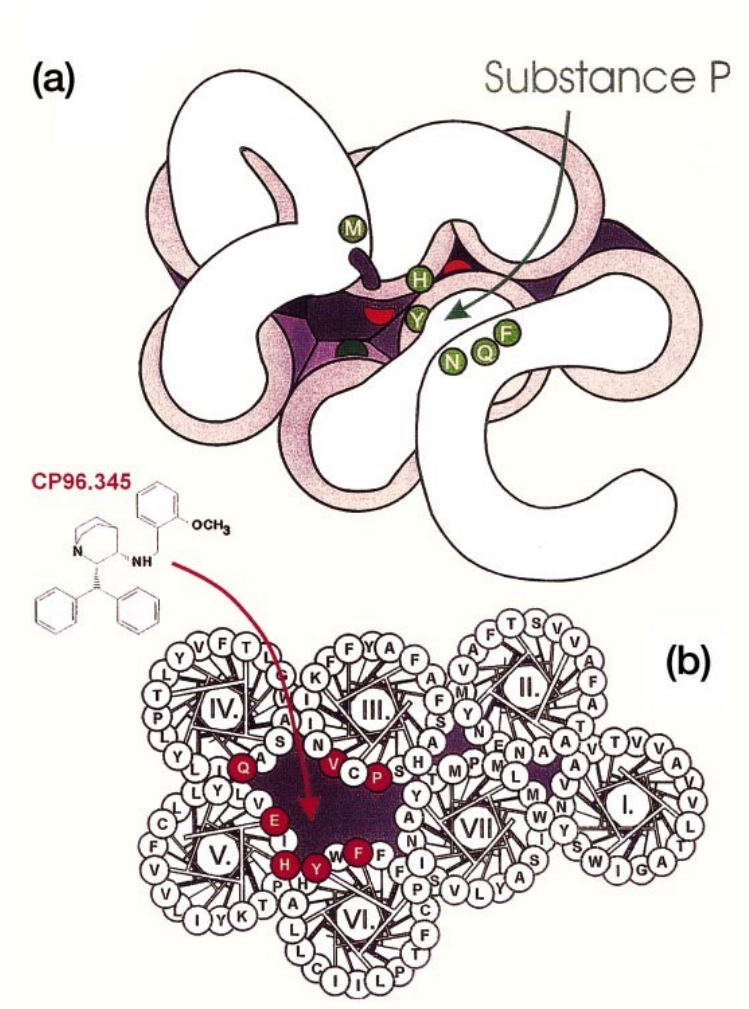


Figura 36. Representación esquemática de los sitios de unión para SP y el antagonista no peptídico CP-96,345 en el RNK1. **A.** Imagen que muestra la visión extracelular del RNK1 en la que se representan los

bucles extracelulares y el extremo amino-terminal. Los círculos verdes representan los residuos que interactúan con la SP. **B.** En la segunda imagen, los círculos rojos representan los sitios de unión del antagonista no peptídico CP-96,345. (Hokfelt, Pernow, & Wahren, 2001). **C.** Modelo estructural del RNK1 con la distintas conformaciones de SP.(Figura tomada de Valentin-Hansen et al., 2014, p. 18052).

2.6.2. Isoformas y subtipos del RNK1

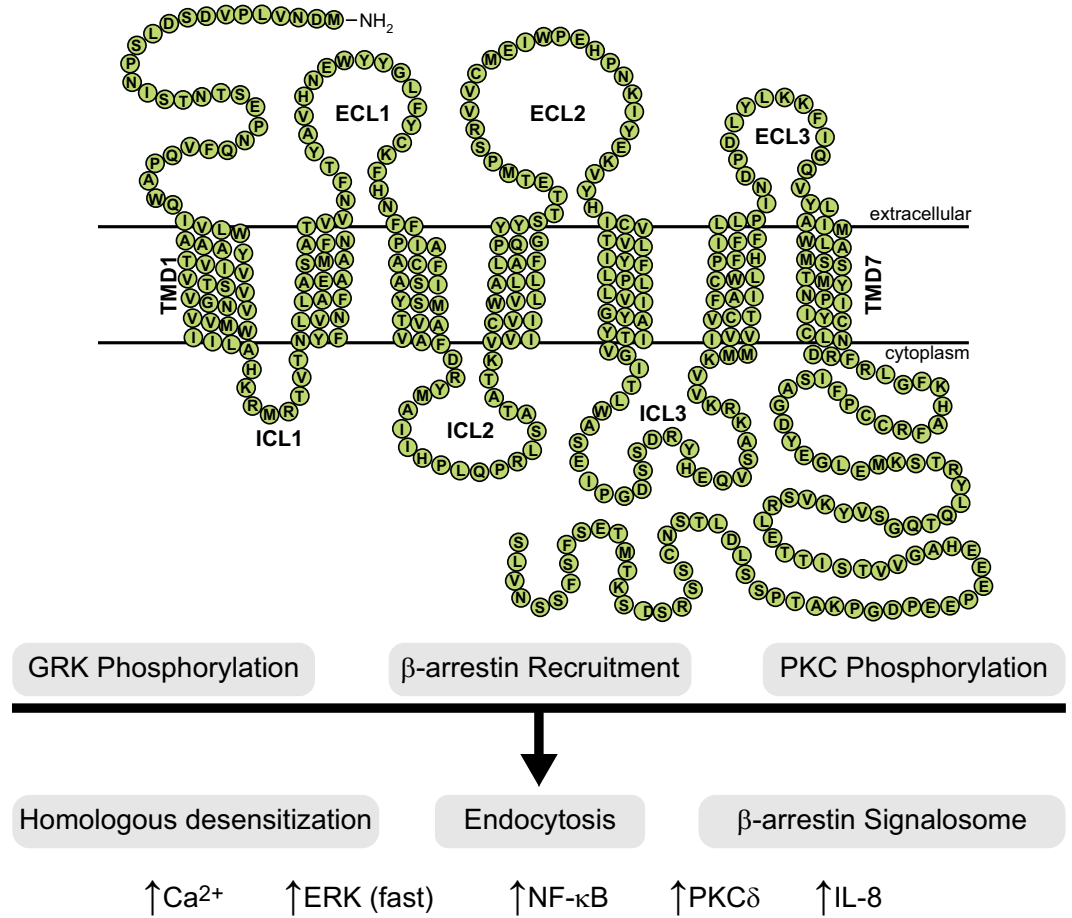
Isoformas del RNK1

En el año 1993 (Kage, Leeman, & Boyd, 1993) se describió la existencia de dos isoformas del RNK1 que procedían del mismo gen, que diferían en la longitud del extremo carboxi-terminal: una isoforma larga (RNK1-fl, del inglés full-length) que contenía 407 aminoácidos, y una forma truncada (RNK1-tr) de 311 aminoácidos (Baker, Morris, & Gibbins, 2003; Fong, Anderson, Yu, Huang, & Strader, 1992; J. P. Lai et al., 2006; J. P. Lai, Lai, et al., 2008).

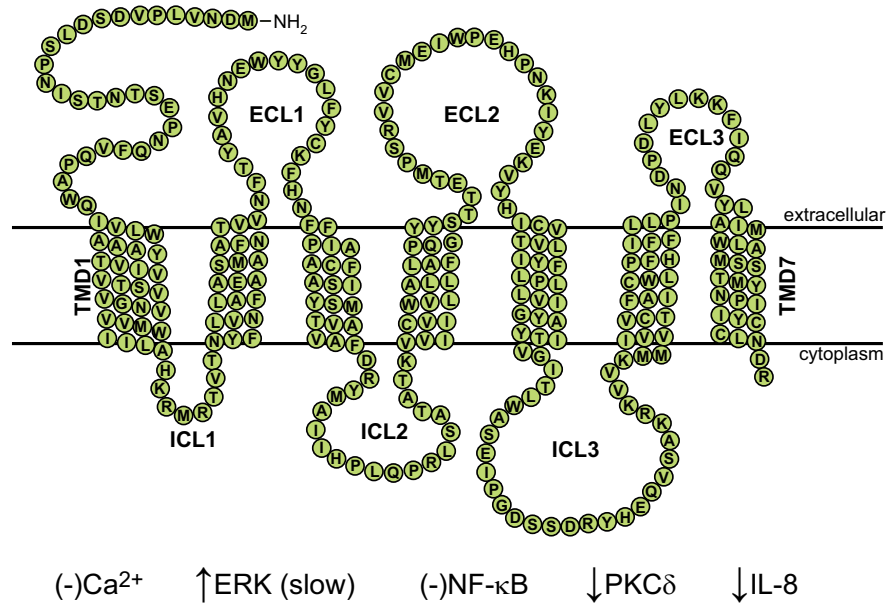
Dado que éste receptor, tiene unas vías de señalización distintas a las de la isoforma larga, esta diferencia de expresión tiene una importancia funcional (J. P. Lai, Lai, et al., 2008), estudiada en tejidos tumorales (Gillespie et al., 2011; Ramkissoon, Patel, Taborga, & Rameshwar, 2007), y en tejidos de cáncer de mama (Ramkissoon et al., 2007) o en líneas celulares epiteliales no tumorales que transforman su fenotipo con gran capacidad proliferativa (Patel, Ramkissoon, Patel, & Rameshwar, 2005).

Existen diferencias en la localización de la expresión de ambas isoformas. La isoforma larga es más prevalente en humanos en diversas regiones del cerebro, con excepción del cerebelo. Sin embargo la isoforma truncada, tiene predominantemente expresión en tejidos periféricos, incluyendo corazón, pulmón, próstata, bazo, monocitos y mucosas del tejido gastrointestinal (Caberlotto et al., 2003; Goode et al., 2000; J. P. Lai, Cnaan, Zhao, & Douglas, 2008; Page, 2006).

A Full-length human NK1R



B Truncated human NK1R



(Viene de la página anterior) **Figura 37.** Representación esquemática de las diferencias estructurales y funcionales de las isoformas de RNK1. **A.** La isoforma larga de RNK1 es fosforilada por GRKs y PKC en el extremo carboxi-terminal e interactúa con las β -arrestinas que median la desensibilización, endocitosis y señalización de los endosomas. El receptor activa Ca^{++2} , ERK1/2, NF- κ B, y PKC- δ y estimula la secreción de IL-8. **B.** La isoforma truncada, pierde la mayor parte del extremo carboxi-terminal, no es fosforilada y no interactúa con las β -arrestinas. Como resultado es ineficaz en la desensibilización y endocitosis y no se induce la formación de señalosomas. La isoforma truncada no activa el aumento de Ca^{++2} y NF- κ B, e inhibe la fosforilación de PKC- δ y la secreción de IL-8. (Imagen tomada de Steinhoff et al., 2014, p. 270).

Las isoformas truncadas y largas pueden tener también distintas funciones mediadas a través de diferentes efectos biológicos (Satake & Kawada, 2006). Lai y Douglas observaron que mientras la SP aumentaba específicamente el calcio intracelular en células embrionarias de riñón humanas (HEK293) transfectadas de forma estable con la isoforma larga, no se encontraba efecto en aquellas transfectadas con la isoforma truncada (J. P. Lai, Lai, et al., 2008). De la misma manera, las células que expresaban la forma completa, activaban la expresión del ARNm de NF- κ B y IL-8, mientras que las que expresaban la forma truncada, presentaban menor expresión. La activación de la proteinquinasa ERK, también se veía alterada en las mismas células: mientras que la fosforilación de esta proteína a través de la isoforma larga era rápida (pico en 1-2 minutos), la activación mediada por la isoforma truncada era más lenta (pico a los 20-30 minutos) (J. P. Lai, Cnaan, et al., 2008). En células que expresan la isoforma larga, la SP estimula la fosforilación de la PKC (Fong et al., 1992; J. P. Lai, Lai, et al., 2008). Se ha evidenciado también que la isoforma truncada tiene 10 veces menos afinidad por la SP que la isoforma larga y provoca una respuesta disminuida al calcio (Fong et al., 1992). La pérdida de ciertos residuos serina y treonina de la zona carboxi-terminal son importantes para la interacción de la quinasa asociada al receptor (GRK) y el reclutamiento de β -arrestinas para su posterior internalización (DeFea, Vaughn, et al., 2000; Garland, Grady, Payan, Vigna, & Bunnett, 1994). Las formas truncadas, por tanto, prolongan las respuestas después de la unión del ligando, porque su desensibilización e internalización están afectadas (Figura 37).

Subtipos de RNK1

Se han descrito varios subtipos de RNK1 dependiendo de su afinidad por diferentes ligandos (Figura 38), que dividen al RNK1 en tres clases diferentes:

1. “Clásico”: que muestra gran afinidad por los ligandos [^3H] SP o [^3H][Pro⁹] SP. Son aquellos receptores para los que la SP es la única TK endógena con alta afinidad (Mussap, Geraghty, & Burcher, 1993).
2. “Sensitivo a septide”: poseen alta afinidad por varias TK como NKA, NKB, NP γ y NPK, así como por algunos análogos sintéticos de SP y NKA, ligandos todos ellos con débil afinidad por los RNK1 clásicos. Unos de los ligandos de alta afinidad, es el fragmento septide 6-11 de la SP, que le da el nombre al receptor, siendo esta secuencia la mínima longitud de cadena necesaria para activarlo, coincidiendo además con los últimos seis aminoácidos de la EKA y EKB. La SP, también presenta alta afinidad por este subtipo (Beaujouan, Saffroy, Torrens, Sagan, & Glowinski, 1999; Page, 2005).
3. “Nuevo RNK1 sensitivo”: más recientemente dado a conocer, que tiene alta afinidad por TK de mayor longitud y no se une a septide o SP (6-11) (Beaujouan et al., 2004).

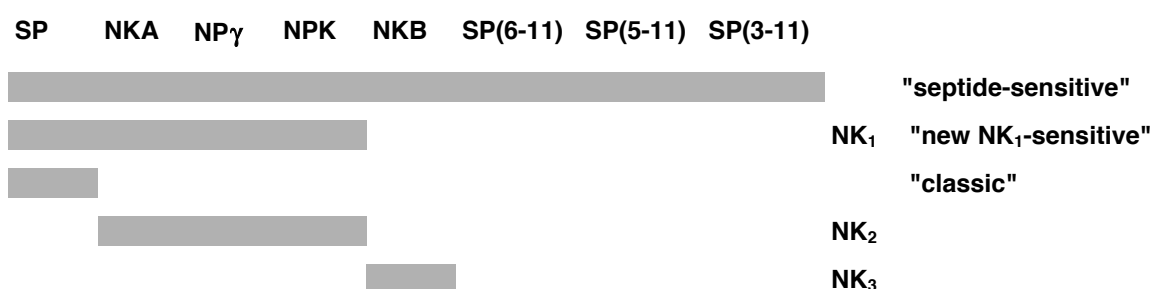


Figura 38. Representación esquemática de la selectividad de las TK endógenas de mamíferos y algunos fragmentos carboxi-terminales de SP frente a los subtipos de RNK1. (Figura tomada de Beaujouan et al., 2004).

2.7. Vías de señalización intracelular de la SP y RNK1

La regulación de todos los procesos mediados por la SP y RNK1, se produce a través de la activación de receptores acoplados a proteínas G (GPCR, del inglés *G protein-coupled*

receptor). Estas proteínas activan a través de segundos mensajeros, rutas de transducción dentro de la célula. Las vías activadas dependen de la naturaleza de las diversas proteínas G que hay dentro de esta familia.

Las principales vías de señalización que han sido estudiadas en la interacción SP y RNK1 (figura 39), se activan a través de los distintos subtipos de subunidades $G\alpha$ (Malbon, 2005; Steinhoff et al., 2014) :

1. Activación de la fosfolipasa C ($PLC\beta$), que conduce a la formación del inositol trifosfato (IP_3) que aumenta el Ca^{++} intracelular, y de diacilglicerol (DAG) que activa la proteinquinasa C (PKC). Esta es una de las vías de señalización principales del receptor NK1.

El aumento del calcio intracelular, conduce a la activación de una proteinquinasa llamada prolina-tirosina quinasa rica 2 (Pyk2, del inglés *protein tyrosine kinase 2*), que regula la actividad de la proteinquinasa Src, que inicia la cascada de fosforilación que activa las proteincinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Della Rocca et al., 1997). La PLC, también puede activar directamente otra proteinquinasa Raf.

2. Activación de adenilatociclasa (AC) que cataliza la conversión del Adenosín trifosfato (ATP) citoplasmático en adenosín monofosfato cíclico (AMPC) y estimula activación de la proteinquinasa A (PKA), que a su vez fosforila el factor de transcripción CREB (del inglés, cAMP-responsive element CRE-binding protein). Esta vía de señalización es activada en menor medida por el RNK1.

3. Activación de fosfolipasa A_2 (PLA_2) y producción de ácido araquidónico (AA), que es precursor de mediadores inflamatorios lipídicos (prostaglandinas (PGs), leucotrienos (LX), y tromboxano A_2 (TXA_2)).

4. Activación de la proteinquinasa asociada a Rho (ROCKs) que regulan la cadena ligera reguladora de la miosina (MLC). La fosforilación de esta proteína se asocia con la formación de pequeñas evaginaciones esféricas surgidas a partir de la membrana conocidas como "*blebs*". Este proceso está relacionado con la apoptosis y también con la desestructuración citoplasmática en el caso de la migración celular.

5. La SP y el receptor NK1 transactivan el factor de crecimiento epidérmico (EGFR) por un mecanismo dependiente de proteína G que activa metaloproteinasas (ADAM) que escinden y liberan agonistas de EGFR. La activación del EGFR dimeriza, fosforila y ensambla un complejo SHC/Grb2 que induce la activación de MAPK y las quinasas

reguladas por señales extracelulares (ERK 1/2) y por tanto, la síntesis de ADN y la proliferación (Yamaguchi, Kugimiya, & Miyazaki, 2005; Yamaguchi, Richardson, Bigner, & Kwatra, 2005).

6. La activación de las MAPK, no sólo depende de las proteínas G y de su vía de señalización clásica, sino a través del complejo de andamiaje multiproteico formado para la internalización del RNK1, y el reclutamiento de sus proteínas por parte de las β -arrestinas. La SP induce el ensamblamiento de un complejo endosómico de señalización (señalosoma), que comprende el RNK1, la β -arrestina, la tirosinquinasa Src y MEKK y ERK1/2. Este complejo promueve la translocación nuclear de ERK 1/2 activado, que es necesario para el efecto proliferativo y antiapoptótico de SP (DeFea, Vaughn, et al., 2000; DeFea, Zalevsky, et al., 2000) (Figura 40).

7. Otra de las vías de señalización propuestas, a raíz del estudio de la fisiopatología de SP en el cáncer, es el efecto que tiene la SP sobre la producción de glucosa estimulando la glucogenólisis (Munoz & Covenas, 2013a). En las líneas de astrocitoma, la SP activa la fosfolipasa D, estimulando la producción de AMPc estimulado por forskolina, lo que induce la liberación de interleuquinas, taurina y glutamato. Esta liberación moviliza el Ca^{++} intracelular, induce la formación de inositol fosfato, estimula la glucogenólisis e influye en el transporte de glutamato y de potasio. La liberación de glutamato y de taurina y de interleukinas aumenta la producción tumoral de la SP induciendo la proliferación celular. Las células tumorales tienen tasas de glucogenólisis 200 veces por encima de las de sus tejidos originarios. El fenómeno por el que las células tumorales producen energía por una alta tasa de glucogenólisis seguida por una fermentación láctica sin anaerobiosis, fue descrito por Warburg (Warburg, 1956). La liberación de la SP proveniente de las células tumorales produce glucogenólisis y la glucosa obtenida sería utilizada por las células tumorales para aumentar su metabolismo. Los antagonistas del RNK1 bloquean la glucogenólisis en las células tumorales contrarrestando así el efecto Warburg (Medrano, Gruenstein, & Dimlich, 1994).

La activación de las vías de señalización conducen a efectos específicos que incluyen inflamación, proliferación, anti-apoptosis, excitación neuronal y migración celular.

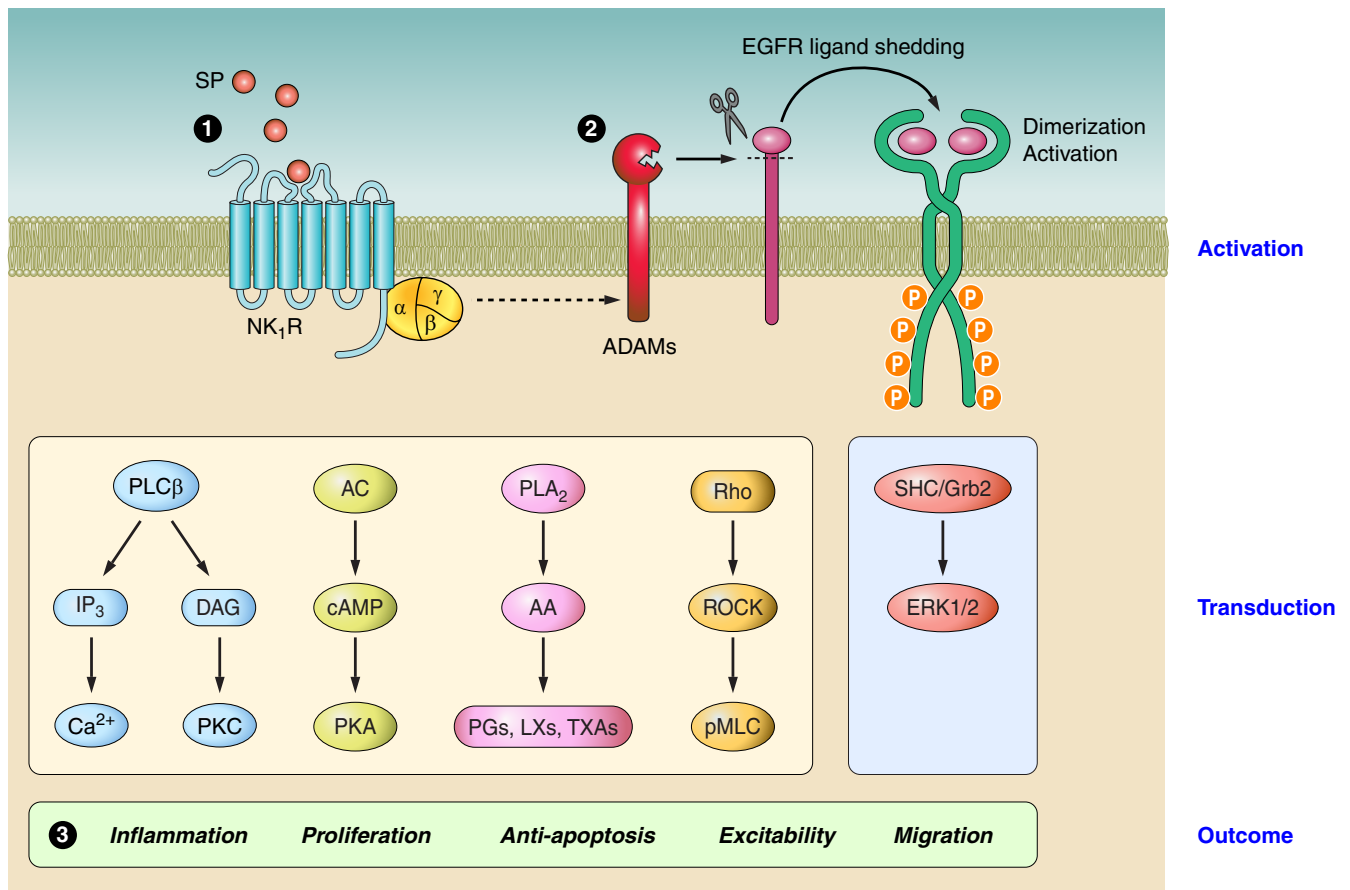


Figura 39. Mecanismos de señalización del RNK1 (ver texto). (Imagen tomada de Steinhoff et al., 2014, p. 271)

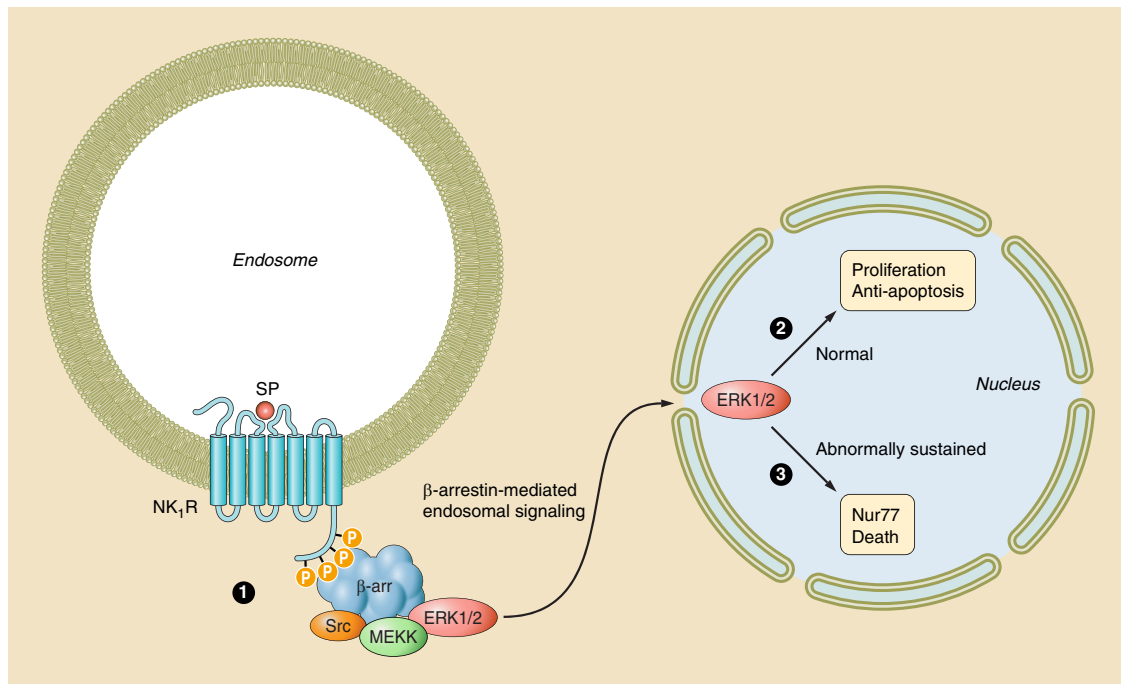


Figura 40. Señalización del receptor NK1 mediante señalomas. 1. Las β-arrestinas reclutan el RNK1, las proteincinasas Src, MEKK y ERK1/2 ensambladas en un señalosoma que media la activación y fosforilación

de ERK1/2, que se trasloca al núcleo. 2. En circunstancias normales, ERK1/2, media las acciones proliferativas y antiapoptóticas de SP. 3. Cuando la activación de ERK1/2 es anormalmente sostenida, el ERK1/2 fosforilado, induce Nur77, que induce la muerte celular. (Imagen tomada de Steinhoff et al., 2014, p. 272).

La señalización de los receptores finaliza mediante mecanismos que eliminan agonistas del fluido extracelular como la neprisilina (NEP), metaloendopeptidasa en la superficie celular, que degrada e inactiva SP en el fluido extracelular limitando la activación del RNK1 (Figura 41).

Las quinasas del receptor acoplado a proteína G (GRKs) y las β -arrestinas, median la desensibilización del RNK1. GRK2, 3, y 5, interactúan y fosforilan el RNK1 (Jorgensen et al., 2008). Las β -arrestinas también reclutan proteína fosfatasa 2A (PP2A), que puede defosforilar y por tanto, resensibilizar el receptor en la superficie de la membrana.

El receptor fosforilado promueve las interacciones de alta afinidad con β -arrestinas, que ensamblan los señalosomas reclutando el receptor junto con Src, MEKK, y ERK1/2, produciendo la rápida internalización de los endosomas tempranos y por tanto, la desensibilización del receptor. Esta internalización parece ser dependiente de clatrina (proteína que recubre las vesículas intracelulares y que se une a la β -arrestina durante la internalización de los receptores), precisando además de dinamina (GTPasa) y Rab5a (Pelayo, Poole, Steinhoff, Cottrell, & Bunnett, 2011; Schmidlin et al., 2001). Rab5a, media también la circulación de los endosomas hacia una localización perinuclear, y Rab4a y Rab11a, median el reciclaje de los receptores (Roosterman, Cottrell, Schmidlin, Steinhoff, & Bunnett, 2004; Schmidlin et al., 2001). El complejo se disocia por la acidificación de los endosomas más tardíos y en el caso concreto de la SP, empieza a degradarse lentamente en la vesículas perinucleares por ECE-1 (enzima de conversión de la endotelina 1) desensamblando el señalosoma, lo que atenúa la señalización de ERK1/2 (Cottrell et al., 2009; Pelayo et al., 2011; Roosterman et al., 2007). Se produce el reciclaje lento del receptor. Si se produce una estimulación sostenida, con altas dosis de SP el receptor se degrada a nivel lisosomal (Cottrell et al., 2006) (Figura 41).

La resensibilización de la respuesta de los receptores NK1 a SP requiere la endocitosis del receptor, la disociación de las β -arrestinas, y el reciclaje del receptor, sin ser su recuperación dependiente de la síntesis de nueva proteína (Grady et al., 1995).

Tras la estimulación del RNK1 mediante la SP, una proporción sustancial de receptores permanecen en la membrana plasmática donde se vuelven a sensibilizar mediante la PP2A, que defosforila y resensibiliza el receptor (J. E. Murphy et al., 2011).

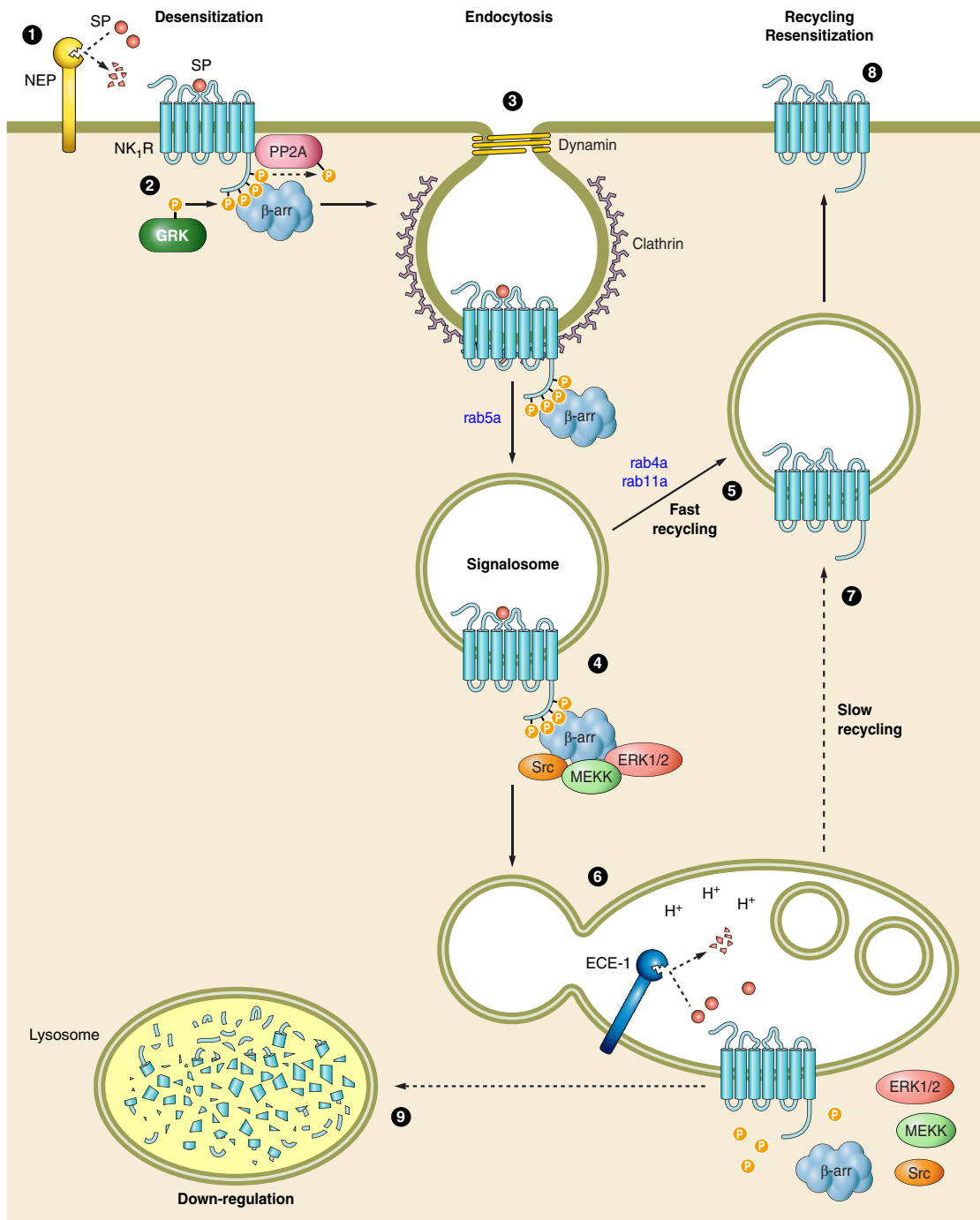


Figura 41. Regulación de señalización de receptor NK1 (ver texto). (Imagen tomada de Steinhoff et al., 2014, p. 274)

2.8. Acciones fisiológicas de la SP y RNK1

Se ha relacionado a la SP y al RNK1, con múltiples acciones fisiológicas.

SISTEMA NERVIOSO CENTRAL. La SP a nivel cortical actúa como modulador de la actividad neuronal (Hokfelt et al., 1982), a nivel del tracto hipotálamo-hipofisario induce liberación de hormonas hipofisarias (Baertschi, Zingg, & Dreifuss, 1981), en la sustancia nigra contribuye al control de la vía extrapiramidal (Somogyi, Priestley, Cuello, Smith, & Bolam, 1982), en la amígdala participa en el comportamiento emocional y la respuesta neuroquímica al estrés (C. De Felipe et al., 1998; Kramer et al., 1998; Mantyh, Hunt, & Maggio, 1984) y en la médula espinal, regula la transmisión simpática en las neuronas nociceptivas (Radhakrishnan & Henry, 1995).

EFFECTOS NEUOTRÓFICOS. La SP induce un aumento en el número de células progenitoras neuronales (Park, Yan, Satriotomo, Vemuganti, & Dempsey, 2007).

INFLAMACIÓN NEUROGÉNICA. Es uno de los ejemplos más notables del papel que la SP desempeña en procesos fisiopatológicos (Severini, Improtta, Falconieri-Erspamer, Salvadori, & Erspamer, 2002), a nivel de SNC y a nivel periférico (Lembeck & Holzer, 1979; Pernow, 1985).

SISTEMA INMUNE. La SP y el RNK1 están expresados en distintas células inmunes y presentan actividad neuroinmunomoduladora sobre la inmunidad celular y humoral.

La SP regula la actividad y función de neutrófilos (Augustyniak et al., 2012; Okaya et al., 2004), macrófagos (Pradhan Nabzdyk et al., 2013; Yaraee et al., 2007), células dendríticas (O'Connell, Pingle, & Ahern, 2005), mastocitos (Shaik-Dasthagirisahab et al., 2013), células NK (del inglés *natural killer*) (Feistritz et al., 2003; Lighvani et al., 2005), y células T (X. Wang et al., 2006).

HEMATOPOYESIS. El complejo SP-RNK1 estimula la proliferación de las células madres hematopoyéticas y mesenquimales de la médula ósea, regulando también el sistema inmunológico a este nivel (H. S. Kang, Trzaska, Corcoran, Chang, & Rameshwar, 2004).

DOLOR. La SP es uno de los principales neurotransmisores implicados en la transmisión del dolor y su posterior integración en el SNC (Severini et al., 2002) y en la generación del estrés y ansiedad que éste desencadena (DeVane, 2001).

SISTEMA CARDIOVASCULAR. La SP provoca un efecto hipotensor intenso acompañado de taquicardia (Erspamer, 1981; Evans, Dixon, Clarke, Conradson, & Barnes, 1988).

APARATO DIGESTIVO. La SP está implicada en la secreción de fluidos y electrolitos, en la motilidad intestinal, en la función inmunitaria e inflamación y en el dolor visceral (Y. Shimizu et al., 2008; M. M. Zhang et al., 2013)

APARATO RESPIRATORIO. La SP contribuye a la inflamación neurogénica, hiperreactividad y secreción de las glándulas seromucosas (Nassini, Materazzi, De Siena, De Cesaris, & Geppetti, 2010; Rogers, 2001).

SISTEMA NEUROENDOCRINO Y REPRODUCCIÓN. La SP actúa en la regulación neuroendocrina de la reproducción (Lasaga & Debeljuk, 2011) a nivel central y a nivel periférico (Kerdelhue, Lenoir, Scholler, & Jones, 2006; Ortega, Salvetti, Baravalle, Lorente, & Mira, 2006; Pintado et al., 2003; Ravina et al., 2007).

APARATO URINARIO. La SP induce inflamación neurogénica y estimula la contracción del músculo liso (Candenas et al., 2005).

PIEL. La SP produce inflamación neurogénica e hiperalgesia (Botz et al., 2013), induce proliferación de fibroblastos y regeneración de la piel lesionada (Delgado, McManus, & Chambers, 2005).

APARATO VISUAL. La SP promueve la inflamación neurogénica a nivel ocular (Mantelli, Micera, Sacchetti, & Bonini, 2010) y favorece la reparación de la córnea y retina ante diversas agresiones (Hong et al., 2015; Nishida, Inui, & Nomizu, 2015; Sloniecka et al., 2015).

2.9. Fisiopatología relacionada con la SP y RNK1

Las acciones fisiopatológicas descritas que ejerce el complejo SP y RNK1 son múltiples.

CÁNCER. Una de las acciones de la SP que ha tenido mayores implicaciones en la investigación es su capacidad mitogénica, comprobada inicialmente en diferentes tipos celulares sanos (células del tejido conectivo, sinoviocitos, fibroblastos y linfocitos (Lotz, Carson, & Vaughan, 1987; Nilsson, von Euler, & Dalsgaard, 1985; Payan, Brewster, & Goetzl, 1983; Ziche, Morbidelli, Pacini, Dolara, & Maggi, 1990)). Igualmente se ha comprobado su capacidad para estimular la neoangiogénesis a través de la inducción de proliferación endotelial (Ziche, Morbidelli, Pacini, Geppetti, et al., 1990).

En la última década, numerosos trabajos, entre los que destacan los realizados por el grupo del Dr. Miguel Muñoz, han puesto de manifiesto que tanto la SP como su receptor NK1 se expresan en diferentes tipos de células tumorales. En todas las líneas tumorales

estudiadas la SP induce proliferación celular y mitogénesis, habiéndose demostrado el efecto antitumoral derivado del bloqueo los RNK1 con diferentes antagonistas específicos de éste receptor. Destacan los estudios llevados a cabo en líneas celulares de carcinoma medular de tiroides (Skrabanek et al., 1979), retinoblastoma (Munoz et al., 2007; Munoz, Rosso, Perez, Covenas, Rosso, Zamarriego, Soult, et al., 2005), neuroblastoma y glioma (Munoz, Perez, Covenas, Rosso, & Castro, 2004; Munoz, Rosso, Perez, Covenas, Rosso, Zamarriego, & Piruat, 2005), leucemia aguda linfoblástica (Munoz, Gonzalez-Ortega, & Covenas, 2012), melanoma (Munoz, Perez, Rosso, Zamarriego, & Rosso, 2004; Munoz, Rosso, Robles-Frias, et al., 2010), adenocarcinoma gástrico y de colon (Rosso, Robles-Frias, Covenas, Salinas-Martin, & Munoz, 2008), cáncer de mama (Bigioni, Benzo, Irrissuto, Maggi, & Goso, 2005), carcinoma laríngeo (Esteban et al., 2009; Munoz et al., 2008), cáncer de pulmón (Munoz, Gonzalez-Ortega, Rosso, et al., 2012), osteosarcoma (Munoz, Berger, et al., 2014), hepatoblastoma (Berger et al., 2014). También se ha estudiado el papel de la SP y su receptor en el tejido tumoral de cáncer de páncreas (Friess et al., 2003), tumor queratoquístico odontogénico (Gonzalez Moles et al., 2008), carcinoma esofágico (Dong et al., 2015) y en el carcinoma oral de células escamosas (Brener et al., 2009).

El uso de antagonistas de RNK1, tiene una acción antitumoral, inhibiendo la proliferación celular, de forma que las células mueren por apoptosis (Berger et al., 2014; Munoz, Berger, et al., 2014; Munoz, Gonzalez-Ortega, Rosso, et al., 2012; Munoz et al., 2007). Se ha demostrado *in vivo* que el uso de antagonistas de RNK1, ejerce un efecto inhibitorio en la expresión de la isoforma truncada del RNK1 (Berger et al., 2014). También el uso de antagonistas de RNK1 inhiben la neoangiogénesis tumoral y la migración celular necesaria para las metástasis y la progresión del cáncer (Guha et al., 2005; Lang et al., 2004).

ENFERMEDADES INFLAMATORIAS. Se ha puesto de manifiesto la participación de SP en diversas enfermedades inflamatorias (T. M. O'Connor et al., 2004): enfermedad inflamatoria intestinal (Y. Shimizu et al., 2008), hepatitis autoinmune (Bang et al., 2003), artritis reumatoide (Inoue et al., 2001; T. M. O'Connor et al., 2004), liquen plano oral, (Gonzalez Moles et al., 2009), asma (Grant et al., 2002), sarcoidosis, rinitis alérgica, infecciones respiratorias por virus (T. M. O'Connor et al., 2004) y mastocitosis (Maintz et al., 2011).

ENFERMEDADES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

1. TRASTORNOS AFECTIVOS. El complejo SP-RNK1 regula la afectividad emocional y la respuesta neuroquímica al estrés, por lo que estaría involucrados en la patogenia de la depresión y otros trastornos psiquiátricos (Kramer et al., 1998).

2. EPILEPSIA. Se ha demostrado el papel proconvulsionante de la SP y de su gen TAC-1 (Zachrisson, Lindefors, & Brene, 1998).

3. EMESIS. La SP está relacionada con el control de la emesis a nivel del SNC (Armstrong, Pickel, Joh, Reis, & Miller, 1981).

4. ADICCIÓN AL ALCOHOL. El complejo SP-RNK1 está implicado en el control del consumo de alcohol (George et al., 2008; Thorsell, Schank, Singley, Hunt, & Heilig, 2010).

5. ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS: se ha relacionado la SP y el RNK1 en la patogenia la esclerosis lateral amiotrófica (Gillberg, Aquilonius, Eckernas, Lundqvist, & Winblad, 1982), la esclerosis múltiple (Vilisaar et al., 2015), la enfermedad de Parkinson (Cui, Yung, & Chen, 2008; Gai, Halliday, Blumbergs, Geffen, & Blessing, 1991), la enfermedad de Alzheimer (Kowall et al., 1993; Rosler, Wichart, & Jellinger, 2001) y la enfermedad de Huntington (Ferrante, Kowall, Richardson, Bird, & Martin, 1986; Richfield et al., 2002).

6. LESIÓN CEREBRAL TRAUMÁTICA. La SP juega un papel fundamental en la degeneración funcional y fisiológica que sigue al daño cerebral agudo (Vink, Donkin, Cruz, Nimmo, & Cernak, 2004).

INFECCIONES VÍRICAS. Se ha demostrado la implicación del complejo SP-RNK1 en la patogenia de diferentes infecciones víricas, (Harrowe, Mitsuhashi, & Payan, 1990; King et al., 2001; P. Robinson et al., 2009; Twardy, Channappanavar, & Suvas, 2011), jugando un papel especialmente importante en la infección por VIH (Douglas et al., 2008; Douglas et al., 2001; Ho, Lai, Li, & Douglas, 2002; L. Schwartz et al., 2013).

INFECCIONES BACTERIANAS. Se ha demostrado la implicación fisiopatológica de la SP en sepsis (Puneet et al., 2006) y en meningitis bacterianas (Chauhan, Kluttz, Bost, & Marriott, 2011; Chauhan, Sterka, Gray, Bost, & Marriott, 2008).

2.10. Antagonistas de los RNK1

La investigación en diferentes moléculas con actividad antagonista frente al RNK1, ha impulsado el desarrollo de nuevos compuestos con una prometedora actividad

terapéutica en diferentes campos. Existen dos tipos de antagonistas de NK1R: peptídicos y no peptídicos.

2.10.1 Antagonistas peptídicos

La mayoría de los trabajos realizados en el diseño y preparación de los antagonistas peptídicos se han centrado en la introducción de D-aminoácidos en la secuencia de la SP (formas dextrógiras o especulares a los L-aminoácidos) (Almeida et al., 2004). Su acción antiproliferativa está en relación a sus características estereoquímicas y no a su composición química (Munoz & Covenas, 2014).

De forma general, podemos decir que los antagonistas peptídicos presentan una afinidad por el RNK1 varias veces menor que sus agonistas naturales, inestabilidad metabólica e imposibilidad para atravesar la barrera hematoencefálica, motivos que limitan su utilidad en estudios *in vivo*. Además, inyectados directamente en el SNC presentan baja potencia, incapacidad para discriminar entre RTK, una actividad agonista residual parcial e inducen degranulación de mastocitos y neurotoxicidad (Quartara & Maggi, 1997).

El primer antagonista descrito fue [DPro²,DTrp^{7,9}]SP, si bien su alta neurotoxicidad llevó a continuar la búsqueda de nuevos compuestos (Leander et al., 1981). Sobre la base del anterior se creó Spantide I, no muy activo y todavía neurotóxico (Folkers, Hakanson, Horig, Xu, & Leander, 1984). Los esfuerzos por aumentar su potencia y disminuir su toxicidad llevaron a la creación de péptidos de segunda generación, entre los que se encuentra Spantide II, con alta actividad antagonista y baja neurotoxicidad probada en animales (Folkers et al., 1990). La modificación en los tres últimos aminoácidos (posición 9-11) de la SP produjo una serie de antagonistas, entre los que destaca por su potencia [DPro⁹,*Pro¹⁰,Trp]SP (Lavielle, Brunissen, Carruette, Garret, & Chassaing, 1994). También se desarrollaron octapéptidos y hexapéptidos. Entre los péptidos sin D-Trp destaca [Orn⁶,AspOBz¹¹]SP(6-11), de demostrada potencia antagonista en el íleon de cobaya (Karagiannis, Stavropoulos, Poulos, Jordan, & Hagan, 1993). Sendide actúa como antagonista selectivo y extremadamente potente en la médula ósea de ratón (T. Sakurada et al., 1992); sus análogos [DTrp⁷]Sendide y [Gln⁶]Sendide se diferencian sólo en un aminoácido y son nuevos antagonistas con un comportamiento similar (S. Sakurada et al., 2002; T. Sakurada et al., 1994). Se ha realizado un esfuerzo por establecer cuál es la

estructura peptídica más pequeña con actividad antagonista frente al NK1R. Uno de estos compuestos es el FK 888, (2-(N-Me)indolil)-CO-Hyp-Nal- NmeBzl, de elevada selectividad y afinidad por el RNK1 en íleon de cobaya (Fujii et al., 1992). También se han preparado una serie de compuestos cíclicos con una conformación rígida que aumenta su selectividad frente al RNK1. Entre éstos destacan FK224, GR82334, GR71251, L668169 e ITF1565, péptidos estudiados en diferentes animales de experimentación cuyo análisis de la estructura conformacional ha puesto las bases para el diseño de otros antagonistas no peptídicos (M. Hashimoto et al., 1992; Meini, Patacchini, & Maggi, 1994; Porcelli et al., 1999; Williams et al., 1993).

[D-Arg1, D-Trp5, 7, 9, Leu11] SP tiene efectos anticancerosos en varios modelos in vitro e in vivo (Guha et al., 2005; Reeve & Bleehen, 1994; Seckl, Higgins, & Rozengurt, 1996; Seckl, Higgins, Widmer, & Rozengurt, 1997; Woll & Rozengurt, 1988). Otros antagonistas desarrollados han sido: (D-Arg1, D-Phe5, D-Trp7, 9, Leu11) SP; (D-Arg1, D-Pro2, D-Trp 7,9, Leu11) SP; [Arg6, D-Trp7,9, MePhe8] SP (6-11); [D-Pro2- Trp7, 9] SP; [D-Pro4, D-Trp7, 9, 10, Phe11] SP (4-11); p-HOPA-DTrp-Phe-DTrp-Leu-Leu-NH₂: NY-3238; DMePhe-DTrp-Phe-DTrp-Leu(CH₂NH)Leu-NH₂: NY-3460.

2.10.2. Antagonistas no peptídicos

Las limitaciones encontradas en los antagonistas peptídicos impulsaron la búsqueda y desarrollo de nuevos antagonistas no peptídicos de diferente naturaleza: esteroidea, amonios cuaternarios derivados de la quinuclidina, derivados del triptófano, análogos de la piperazina o compuestos piperidínicos (Quartara & Maggi, 1997).

El lugar de unión para los antagonistas de RNK1 y SP son diferentes. SP es hidrofílica y se une al receptor en los bucles extracelulares, mientras que los antagonistas del RNK1 son lipofílicos y se unen más profundamente entre los dominios transmembrana III-VI (Hokfelt et al., 2001). Después de unirse al receptor, los antagonistas de RNK1, pueden bloquear las acciones de SP. La acción del antagonista es concentración y tiempo dependiente. Los efectos farmacológicos de los antagonistas de RNK1 son: ansiolítico, antidepresivo, antiemético, antimigrañoso, neuroprotector a nivel del SNC, disminuye la adicción al alcohol, analgésico, antiinflamatorio, hepatoprotector y evita la proliferación vírica. Con respecto al cáncer, los antagonistas RNK1 ejercen una acción antitumoral, induciendo muerte celular por apoptosis, efectos antiangiogénicos e inhibitorios de la

migración de las células tumorales (Munoz & Covenas, 2013a; Munoz, Rosso, & Covenas, 2010).

Algunos de los antagonistas de RNK1, han sido utilizados en ensayos clínicos y son seguros. Ejemplos de estos fármacos con aprepitant y su profármaco fosaprepitant, casopitant (GW-679769), vofopitant (GR-205171), L-759.274, CP-122.721, Ezlopitant (CJ-11.974), rolapitant, L-754.030, serlopitant and CJ-11.974 (Munoz & Covenas, 2013b).

El primer antagonista no peptídico descrito con actividad selectiva frente al RNK1 fue CP-96,345 que presentaba alta afinidad por el RNK1 y lugares de unión del Ca^{++} , por lo que tenía efectos sistémicos no relacionados con el RTK (Snider et al., 1991). Sobre la estructura de éste se elaboró CP-99,994 (Piedimonte et al., 1993), también con alta afinidad por el RNK1 pero baja biodisponibilidad. También sobre la base de CP-96,345 se sintetizó ezlopitant (CJ- 11,974) (Reed-Hagen, Tsuchiya, Shimada, Wentland, & Obach, 1999), con actividad antiemética postquimioterapia comprobada en un ensayo clínico en fase II (Hesketh et al., 1999). CP-122,721 es un análogo de CP-99,994 (McLean et al., 1996) cuya actividad antiemética, antidepresiva y antiinflamatoria ha sido bien estudiada sin alcanzar una repercusión clínica relevante. Hay que destacar L-733,060, un antagonista desarrollado a partir de CP-99,994 (Huang, Liu, Wei, & Ruan, 2003) muy bien estudiado, que presenta actividad analgésica (Parenti, Arico, Ronsisvalle, & Scoto, 2012), antidepresiva (Guiard et al., 2004), ansiolítica y frente a trastornos del estado de ánimo (Rupniak et al., 2000), eficacia en la enfermedad inflamatoria hepática (Bang et al., 2003) y actividad antitumoral demostrada en diferentes líneas celulares tumorales humanas (Munoz, Gonzalez-Ortega, & Covenas, 2012; Munoz, Gonzalez-Ortega, Rosso, et al., 2012; Munoz, Perez, Covenas, et al., 2004; Munoz, Perez, Rosso, et al., 2004; Munoz et al., 2008; Munoz, Rosso, Perez, Covenas, Rosso, Zamarriego, & Piruat, 2005; Munoz, Rosso, Perez, Covenas, Rosso, Zamarriego, Soult, et al., 2005; Rosso et al., 2008).

Entre estos antagonistas también destaca MK-869, modificado del antagonista L-742.694, conocido posteriormente como aprepitant, que ha sido empleado para el tratamiento del dolor (Chizh et al., 2007), prurito (Santini et al., 2012), migraña, emesis (Tattersall et al., 2000) , trastornos psiquiátricos como depresión (Kramer et al., 1998) y como fármaco antitumoral (Kast, 2009; Munoz, Gonzalez-Ortega, & Covenas, 2012; Munoz, Gonzalez-Ortega, Rosso, et al., 2012; Munoz, Rosso, Robles-Frias, et al., 2010). La FDA (*Food and Drug Administration*) aprobó la indicación de aprepitant oral para las

náuseas y vómitos inducidos por quimioterapia. Una proforma de este fármaco, fosaprepitant, está también aprobada para su empleo intravenoso (Navari, 2007).

El antagonista L-732.138 muestra un antagonismo competitivo y selectivo por RNK1, provocando su administración atenuación de hiperalgesia (Cahill & Coderre, 2002), antagonismo de la permeabilidad vascular inducida de la piel. Presenta efecto antitumoral frente a glioma, neuroblastoma, carcinoma de laringe (Munoz et al., 2008), y cáncer de páncreas (X. Li et al., 2013).

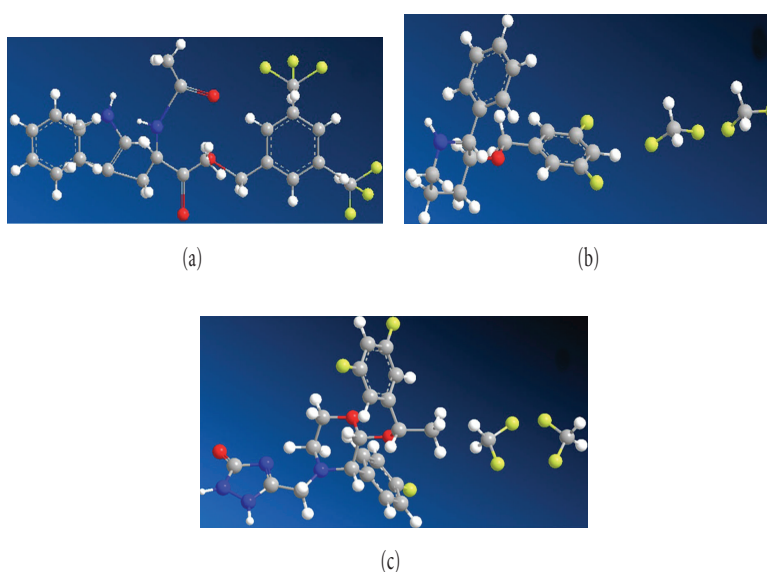


Figura 42. Representación tridimensional de la estructura química de L-732,138 (a), L-733,060 (b), y aprepitant (c). Los átomos de carbono están representados en gris, hidrógeno en blanco, nitrógeno en azul, oxígeno en rojo y flúor en amarillo (Imagen tomada de Rosso, Munoz, & Berger, 2012, p. 10).

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS:

La mola hidatidiforme humana expresa tanto la SP como su receptor NK1, al igual que sucede en otros tejidos humanos con proliferación celular aumentada en los que se ha demostrado tanto la expresión de SP y del receptor NK1 como su participación en la fisiopatología de la enfermedad.

La demostración de esta hipótesis supondría el punto de inicio para una futura línea de investigación. La comparación de la expresión y patrón de distribución de la SP y del receptor NK1 en las diferentes patologías de carácter proliferativo que constituyen la ETG nos permitiría conocer el papel que estas moléculas desempeñan en dichas patologías y plantear diferentes opciones terapéuticas, fundamentalmente en los casos de ETG persistente con mayor riesgo de extensión y metástasis de la enfermedad.

OBJETIVOS:

1. Estudiar la **expresión, localización y distribución de la Sustancia P** en las distintas estructuras y células que constituyen la mola hidatidiforme humana.
2. Estudiar la **expresión, localización y distribución del receptor NK1** en las distintas estructuras y células que constituyen la mola hidatidiforme humana.

III. MATERIAL Y MÉTODO

1. MÉTODO DE TRABAJO

1.1. Diseño del estudio

Estudio observacional descriptivo anatómico-morfológico semicuantitativo de la expresión y distribución inmunohistoquímica de SP y los RNK1.

1.2. Población de estudio y tamaño muestral

Se revisaron todas las muestras desde el 1 de Enero de 2007 hasta el 31 de Marzo de 2015 recibidas en el Servicio de Anatomía Patológica en el Hospital Universitario Virgen del Rocío tras realización de legrado por aspiración con diagnóstico de aborto, lo que supuso un total de 8608 muestras. Del total de muestras, se seleccionaron las que cumplían criterio diagnóstico histológico final de mola hidatidiforme humana. Del total de los casos elegibles que pudieran ser incluidos en la investigación y que fueron 84, se seleccionó una muestra de 30 legrados por aspiración atendiendo a los siguientes criterios:

CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

1. Muestras correspondientes a molas hidatidiformes completas y parciales, que cumplan criterios diagnósticos histológicos valorados mediante microscopía óptica (hematoxilina-eosina), apoyadas mediante técnicas de diagnóstico inmunohistoquímico habituales del Servicio de Anatomía Patológica (expresión de proteína p57) o de biología molecular (cariotipo determinado mediante técnica de FISH).
2. Muestras de molas hidatidiformes obtenidas a partir de legrado por aspiración.
3. Material histológico en buen estado de conservación, sin daños o artefactos en su procesamiento.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

1. Empleo por la paciente de esteroides o fármacos inmunosupresores en los meses anteriores a la obtención de la muestra.
2. Material histológico en mal estado de conservación, con daños o artefactos en su procesamiento.
3. Muestras de molas hidatidiformes humanas con escaso tejido incluido en bloques de parafina en Biobanco, ya que es una condición no suministrar tejidos que pudieran agotarse. Siempre debe mantenerse un fondo del biorecurso que pudiera requerir la paciente para estudios futuros.

Para asegurar la representatividad de la muestra, se seleccionaron los casos a través de un muestreo aleatorio simple. No existe cálculo previo del tamaño muestral, porque se trata de un estudio descriptivo y al realizar una técnica de muestreo de forma probabilística, queda asegurada la representatividad de la muestra. Por tanto, los resultados obtenidos podrían inferirse a las 84 muestras de molas hidatidiformes.

Para cada caso del estudio, se analizan tres muestras correspondientes a hematoxilina-eosina e inmunohistoquímica para ambas proteínas a estudio: SP y RNK1. El número total de laminillas histológicas estudiadas ha sido de 90.

1.3. Aspectos éticos

El estudio se ha llevado a cabo siguiendo los principios éticos para las investigaciones en seres humanos según la Declaración de Helsinki de 1964, actualizada en Fortaleza en 2013 (World Medical, 2013), y las Pautas Éticas Internacionales para la investigación biomédica en seres humanos del Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas del año 2002 (Council for International Organizations of Medical, 2002).

Se garantizará la protección de la intimidad personal y el tratamiento confidencial de los datos personales que han resultado de la actividad de investigación biomédica, conforme a lo dispuesto en la Ley 41/2002, de 14 de noviembre y sus modificaciones (Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica, , 2002), y en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre (*Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre,*

de Protección de Datos de Carácter Personal., 1999). Esto se llevó a cabo mediante la anonimización de los datos a través de la codificación de los pacientes al introducirlos en una base de datos informatizada, de manera que sólo fueran identificables por los investigadores.

Se solicitó la valoración del proyecto de tesis por parte del Comité de Ética de la Investigación del Hospital Universitario Virgen del Rocío, con informe favorable con fecha de veinticuatro de Abril de 2013 (Acta 04/13), y se obtuvo tras la solicitud de biorecursos al Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía, un acuerdo de cesión de las muestras biológicas tras haber sido informada ésta de forma positiva por el Comité Científico y de Ética del citado Biobanco. Según este acuerdo, además de la legislación arriba referida, la investigación realizada en este estudio, ha tenido que hacer uso de las muestras biológicas con la normativa especificada para dichos fines: Ley 14/2007 de 4 de Julio (*Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica.*, 2007) y Real Decreto 1716/2011 (*Real Decreto 1716/2011, de 18 de noviembre, por el que se establecen los requisitos básicos de autorización y funcionamiento de los biobancos con fines de investigación biomédica y del tratamiento de las muestras biológicas de origen humano, y se regula el funcionamiento y organización del Registro Nacional de Biobancos para investigación biomédica.*, 2011) (Anexos I y II).

La información podrá ser requerida por el Comité de Ética de la Investigación o por la autoridad sanitaria pertinente.

2. MATERIAL DEL ESTUDIO Y TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA

2.1. Material biológico: tejido de mola y anticuerpos

Se solicitaron a través del Servicio de Anatomía Patológica muestras de legados por aspiración con diagnóstico de **molos hidatidiformes**, completa e incompleta. Estas muestras fueron solicitadas según el procedimiento establecido en el Hospital Universitario Virgen del Rocío para petición de Biorecursos al Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía.

Dicho material se solicitó en forma de dos tipos de biorecursos:

- Por un lado, los cristales portaobjetos procedentes del Servicio de Anatomía Patológica usados para el diagnóstico del citado material, tanto la

tinción de hematoxilina-eosina, como sus correspondientes estudios complementarios en cada caso (inmunohistoquímica para valorar expresión de proteína p57). Este material se usó para revisar histológicamente las muestras sin necesidad de realizar de nuevo el mismo estudio en cada caso y optimizar de este modo el tejido existente en forma de bloques de parafina para posibles estudios de diagnóstico, pronóstico o tratamiento, entre otros, de utilidad futura para las pacientes.

- Además se solicitaron cortes histológicos sin teñir en cristales portaobjetos apropiados para estudio inmunohistoquímico para realizar las tinciones del estudio presente SP Y RNK1.

Para dicho estudio inmunohistoquímico, se emplearon los siguientes **anticuerpos**:

- Anticuerpo policlonal de conejo anti RNK1 (Sigma-Aldrich, España: Referencia S8305 y Lote 083M4759 de 2014 de; 2 ml) utilizando una solución de anti-RNK1 y diluyente en proporción 1:1000.
- Anticuerpo policlonal de conejo anti Sustancia P (Sigma-Aldrich, España: Referencia S1542 y Lote 030M4767 de 2014; 2 ml) utilizando una solución de anti-SP y diluyente en proporción 1:2000.

2.2. Procesamiento de muestras y descripción de inmunohistoquímica indirecta

Las muestras fueron fijadas en formaldehído al 4% (según es necesario por el protocolo indicado en la ficha técnica de los anticuerpos usados), e incluidas en bloques de parafina según el protocolo habitual del servicio de Anatomía Patológica del Hospital Virgen del Rocío.

Se describe a continuación el procesamiento de las muestras para la realización de la técnica de inmunohistoquímica indirecta.

1. Corte y desparafinado de las muestras.

Se realizaron cortes de los tejidos entre 3-5 μm con un microtomo y se montaron en portaobjetos destinados específicamente para inmunohistoquímica.

Las muestras de tejido parafinado se incubaron durante 24 horas en la estufa a 37°C y 30 minutos antes de la realización de la inmunohistoquímica a 60° C.

2. Recuperación antigénica inducida por calor.

Se realizó la recuperación del epítipo inducida por calor en el sistema Dako PT link (Dako, España), junto con la rehidratación del tejido.

Para este proceso se emplearon las soluciones incluidas en el kit de inmunohistoquímica utilizado EnVision™ FLEX, High pH, (link) (Dako, España).

Se sumergieron los cortes de tejido en la solución EnVision™ FLEX solución de recuperación antigénica, pH bajo (50x) tampón de citrato (pH 6,1) (código K8005/DM829), diluida en agua destilada (1:10), durante 20 minutos a 96°C.

Posteriormente tras dejar enfriar los cortes a 65°C, se realizó el lavado con solución EnVision™ FLEX Buffer de lavado (20x) (Código K8007/DM831), tamponada con solución Tris diluida con agua destilada (1:20) y a temperatura ambiente, durante 5 minutos.

3. Procedimiento automatizado de tinción inmunohistoquímica en analizador Autostainer Link. Preparación de los reactivos.

El procesamiento y tinción del tejido se realizó de forma automatizada y estandarizada en DakoAutostainer Link analizador (Dako, España), mediante kit de inmunohistoquímica comercializado EnVision™ FLEX, High pH, (link) (Dako, España).

De todas las soluciones necesarias para la realización de la inmunohistoquímica, se incorporaron directamente al analizador, por no precisar preparación:

- EnVision™ FLEX reactivo bloqueante de peroxidasa (código SM801): para la inhibición de la peroxidasa endógena
- EnVision™ FLEX/HRP (código SM802): dextrano unido a moléculas de peroxidasa y moléculas de anticuerpo secundario de cabra contra inmunoglobulinas de conejo.
- EnVision™ FLEX + rabbit (linker) (código K8009/SM805): para la incubación de cortes con anticuerpo secundario.
- EnVision™ FLEX Hematoxilina (código K8008/SM806): para la realización de la contratinción.
- EnVision™ FLEX Buffer de lavado (20x) (Código K8007/DM831)

Sin embargo, fue necesaria la preparación de las siguientes soluciones (en la cantidad establecida según el protocolo de inmunohistoquímica para el analizador):

- EnVision™ FLEX Sustrato buffer (código SM803) y EnVision™ FLEX Cromógeno DAB+ (diaminobenzidina) (código DM827) en una proporción de 1 gota de cromógeno por cada 20 ml de sustrato.

- Dilución de anticuerpos policlonales primarios de conejo (anticuerpo antisustancia P (Referencia S1542, Sigma-Aldrich, España) en proporción 1:2000 y anti RNK1 (Referencia S8305, Sigma-Aldrich, España) en proporción 1:1000, con solución EnVision™ FLEX Diluyente de anticuerpo (código K8006/DM830).

Se programó en el software del autoanalizador, los pasos de tinción y los tiempos de incubación de los cortes en inhibidor de la peroxidasa endógena, en antisuero primario específico para cada anticuerpo, en anticuerpo secundario marcado con peroxidasa, en el revelador con diaminobenzidina y en la tinción de hematoxilina.

En el caso del número de portaobjetos de nuestro estudio, se requirió un tiempo de tres horas de procesamiento.

4. Deshidratación del tejido y montaje

Tras finalizar el procedimiento automatizado con la contratinción con hematoxilina, se llevaron las muestras a agua destilada, y a continuación, se realizó la deshidratación de las muestras mediante el paso de los portaobjetos por una batería de alcoholes a concentración creciente: 60 % (30 segundos), 70 % (30 segundos), 80 % (30 segundos), 90 % (5 minutos), 96 % (5 minutos), 100 % (5 minutos).

Finalmente se pasaron las muestras por tres cubetas de xiloles, para eliminar el alcohol: de forma rápida en las dos primeras y en la tercera, el tiempo necesario hasta el montaje.

A cada cristal sacado del xilol, se le pone un cubreobjetos al que se le ha añadido, pegamento Pertex.

Tras el secado, las muestras están preparadas para la visualización del resultado con el microscopio óptico.

5. Control de calidad.

En cada proceso de inmunohistoquímica se incluyó también una muestra de placenta como control positivo tanto de SP como de RNK1, previamente analizado, valorado, validado y publicado (Munoz, Rosso, Robles-Frias, et al., 2010), con el fin de asegurar un rendimiento correcto de todos los reactivos aplicados.

En cada proceso de inmunohistoquímica se incluyó una muestra como control negativo de especificidad del anticuerpo sustituyendo el anticuerpo primario por suero.

2.3. Valoración e interpretación de los resultados

Las muestras fueron valoradas e interpretadas con la colaboración de un facultativo especialista de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Virgen del Rocío.

Para cada uno de los 30 casos de este estudio se valoró la expresión inmunohistoquímica de SP y RNK1 de forma sistemática en los 5 tipos celulares diferentes presentes en la histología de la mola hidatidiforme y en 2 tipos celulares más presentes en el material tisular obtenido del legrado por aspiración: el trofoblasto intermedio y la decidua.

Para la interpretación inmunohistoquímica, en cada muestra se puntuó tanto la intensidad como la extensión de la tinción mediante estimación visual, para cada uno de los 7 elementos histológicos ya definidos, empleando para ello una escala semicuantitativa previamente definida y de uso habitual anatomopatológico conocida como método Allred.

En este sistema, los criterios de valoración de extensión e intensidad son los siguientes:

- **EXTENSIÓN:** expresado en porcentaje de células con inmunoreacción a SP o RNK1 con respecto del total de células:
0: (0%), 1: (<1%), 2: (1-10%), 3 (11-33%), 4 (34-66%), 5 (>67%)
- **INTENSIDAD:**
0: nula, 1: débil, 2: intermedia, 3: fuerte.

De la suma de ambos parámetros, se obtiene una puntuación final en un rango que oscila entre 0 y 8.

La positividad de la expresión de SP y RNK1, fue determinada si la tinción a nivel nuclear y/o citoplasmática, era positiva en al menos el 10% de las células.

Se estableció una gradación de la tinción inmunohistoquímica en función de la puntuación total obtenida:

- Tinción negativa: puntuación Allred menor o igual a 2.
- Tinción positiva intermedia: puntuación de Allred igual a 3 ó 4.

- Tinción positiva alta: puntuación de Allred igual o mayor a 5.

Este sistema de evaluación que originalmente fue definido para la valoración semicuantitativa de la expresión inmunohistoquímica de la expresión de receptores hormonales en el cáncer de mama (Allred et al., 1993; Allred, Harvey, Berardo, & Clark, 1998; Harvey, Clark, Osborne, & Allred, 1999), se ha extendido en la actualidad como instrumento para la valoración de la tinción inmunohistoquímica de la expresión de diversos biomarcadores en múltiples tejidos (Balan et al., 2011; Basturk et al., 2012; Bjorndal, Larsen, Godballe, & Kroghdahl, 2011; Gamboa-Dominguez et al., 2004; T. Hashimoto, Yamakawa, Kimura, Usuba, & Toyono, 2013; Henderson-Jackson et al., 2011; Hibi et al., 2013; Imai et al., 2013; Mohan et al., 2006).

Se obtuvieron fotografías de las muestras más representativas mediante un microscopio Olympus BX61, dotado con objetivos de diferentes aumentos (4X, 10X, 20X, 40X, 60X, 100X) acoplado a una cámara fotográfica digital Olympus modelo DP72.

Para el procesamiento de las imágenes se empleó el software *CellSensDimension* (versión 1.4, 2010, Olympus Corporation). Las imágenes del apartado resultados, se obtuvieron mediante la opción que ofrece este programa de edición fotográfica de superponer diferentes imágenes obtenidas varios planos del eje Z (separados entre sí por 0.1 μm), integrando los diferentes puntos enfocados de cada plano en una sola imagen final.

IV. RESULTADOS

1. DESCRIPCIÓN DE LA SERIE DE CASOS

Características epidemiológicas

Se presentan 30 casos de mujeres en un rango de edad entre 18 y 48 años, con una edad media de 32 años. De los 30 casos, un 90% tenían origen caucásico, mientras que 3 casos eran mujeres de origen árabe, sudamericano y africano.

Antecedentes obstétricos

Presentaron una paridad media de 2,46 gestaciones, siendo primíparas 7/30 mujeres, secundíparas 14/30 mujeres, tercíparas 3/30 mujeres, cuartíparas 5/30 mujeres y una mujer decípara. Esta última paciente agrupó varios factores de riesgo para el desarrollo de mola, pues era de origen africano, de 48 años de edad y fue la única paciente con antecedente de gestación molar previa.

El 36% de las pacientes (11/30), presentaban antecedentes de abortos; de ellas, 8 presentaron un único aborto previo, y 3 pacientes tuvieron dos abortos previos.

Clínica de presentación

El 90 % de las pacientes (27/30), acudieron al hospital teniendo como motivo de consulta una metrorragia del primer trimestre, que es el signo clínico de presentación más frecuentemente descrito. En 2 casos, las pacientes acudieron al hospital derivadas por sospecha de gestación molar diagnosticada en control del programa de seguimiento de la gestación. En un caso el motivo de consulta fue dolor en hipogastrio.

La edad gestacional media al diagnóstico fue de 64,4 días (9 semanas), con un rango entre 4 y 13 semanas, inferior a la descrita en la literatura (Lurain, 2010).

Presentaban quistes ováricos 3 pacientes al diagnóstico de la gestación molar.

Ninguna de las pacientes presentó clínica clásica de gestación molar.

Diagnóstico en la presentación clínica

En el 66% de los casos (20/30), hubo un diagnóstico ecográfico de sospecha (porcentaje ligeramente superior a los descritos en la literatura (Fowler et al., 2006; Johns et al., 2005)). El diagnóstico de las otras 10 pacientes se produjo tras el estudio anatomopatológico de los restos decíduocoriales del legrado por aspiración.

Se diagnosticaron quistes ováricos ecográficamente en el 10% de los casos (3/30).

Se solicitaron niveles de hCG a 20 pacientes en el momento del diagnóstico antes del legrado por aspiración (3 pacientes con diagnóstico de mola parcial y 17 con diagnóstico de mola completa). Sólo el 50% de las pacientes a las que se realizó el control previo de hCG, presentaban cifras por encima de 100.000 mU/mL (2 pacientes con mola parcial y 7 con mola completa).

Diagnóstico anatomopatológico

Se enviaron restos deciduocoriales de todas las pacientes al Servicio de Anatomía Patológica, realizándose estudio morfológico junto con estudio inmunohistoquímico de expresión de la proteína p57 en todos los casos.

En 8 casos se añadió como prueba complementaria el estudio cromosómico mediante técnica de FISH, no habiendo sido concluyente la inmunohistoquímica en 3 casos.

El diagnóstico final fue de mola hidatidiforme parcial en 8 casos y de mola hidatidiforme completa en 22 casos.

Tratamiento

Todas las pacientes se sometieron a legrado por aspiración en el momento de la presentación clínica de la metrorragia, con o sin diagnóstico de sospecha de enfermedad molar.

Seguimiento

Las pacientes siguieron controles séricos de hCG semanales hasta mantener la negativización en al menos tres determinaciones consecutivas, después de lo que se solicitaban controles séricos mensuales o bimensuales hasta completar el tiempo de seguimiento establecido, siguiendo el protocolo consensuado en las recomendaciones de la FIGO (Ngan et al., 2012).

Se perdió el seguimiento de 3 pacientes que no acudieron a revisión tras la fecha del legrado por aspiración.

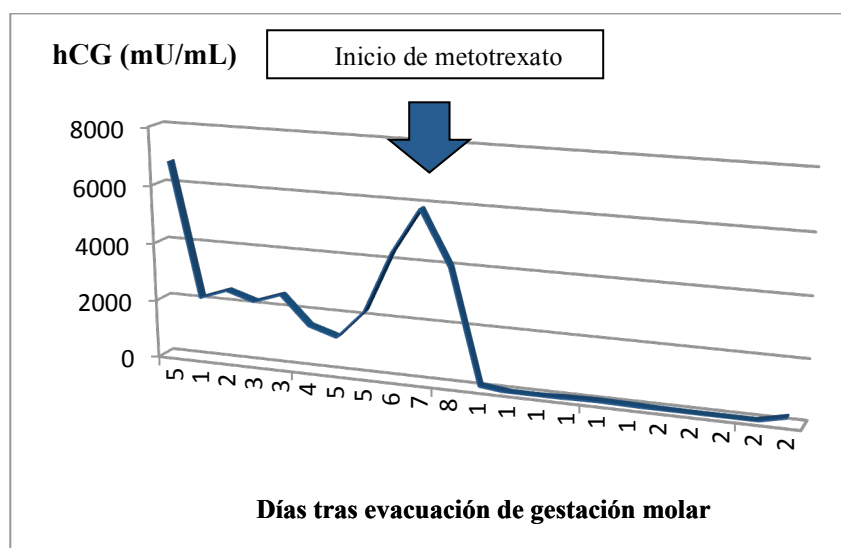
La duración media del seguimiento fue de 350 días.

El tiempo medio de realización de la primera determinación sérica de hCG fue de 16 días tras la realización del legrado. Tan sólo se realizó control postevacuación al día siguiente del legrado a 6 pacientes.

El tiempo medio de negativización de los niveles séricos de hCG, considerando negativo el valor menor de 5 mU/mL, fue de 50 días (las molas parciales con una media de 44 días y las molas completas 60,5 días).

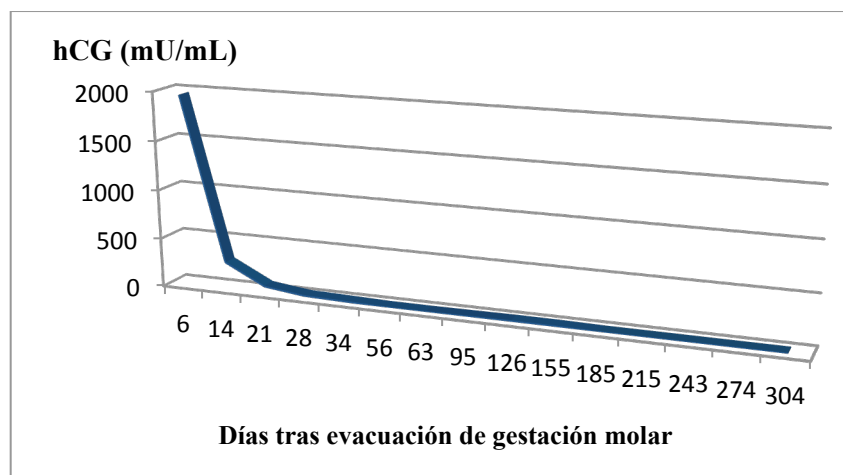
Evolución

De las 27 pacientes que completaron el seguimiento, tan sólo una paciente con antecedentes de mola completa evacuada, cumplió criterios de ETG persistente. La paciente presentó dos criterios para el diagnóstico: niveles séricos mantenidos de hCG durante 3 semanas con posterior ascenso de la misma en 3 determinaciones consecutivas. Inició tratamiento con metotrexato a los 75 días de la evacuación de la gestación molar, con buena evolución posterior de los niveles de hCG (Gráfica 1).



Gráfica 1. Evolución de los niveles de hCG en la paciente con criterios de ETG persistente.

El resto de las pacientes presentaron un descenso adecuado de las cifras de hCG en controles evolutivos y no requirieron tratamiento (Gráfica 2).



Gráfica 2. Ejemplo de paciente con evolución de los niveles de hCG en mola sin evolución a ETG persistente.

A todas las pacientes en seguimiento se les realizó radiografía de tórax como estudio de extensión de la ETG, en la que no se evidenció enfermedad metastásica en ningún caso.

En todos los casos se recomendó la anticoncepción hormonal durante un año como método de planificación familiar. Hubo 4 mujeres que presentaron test de gestación positivo antes de cumplir el tiempo de seguimiento establecido, siendo una de ellas la paciente diagnosticada de ETG persistente, que a los 285 días de seguimiento presentó ascenso de hCG, siendo diagnosticada de gestación situando la concepción simultáneamente con el último ciclo de metotrexato.

2. TINCIÓN CON HEMATOXILINA-EOSINA

La tinción con hematoxilina-eosina de cada caso estudiado permitió corroborar la adecuada conservación y estructura de los restos deciduocoriales.

En esta imagen podemos observar vellosidades placentarias de primer trimestre de gestación procedentes de un legrado por aspiración de restos abortivos no molares, con hallazgos histológicos que nos permitieron apreciar las características diferenciales que definen la enfermedad molar objeto de este estudio (Figura 43).

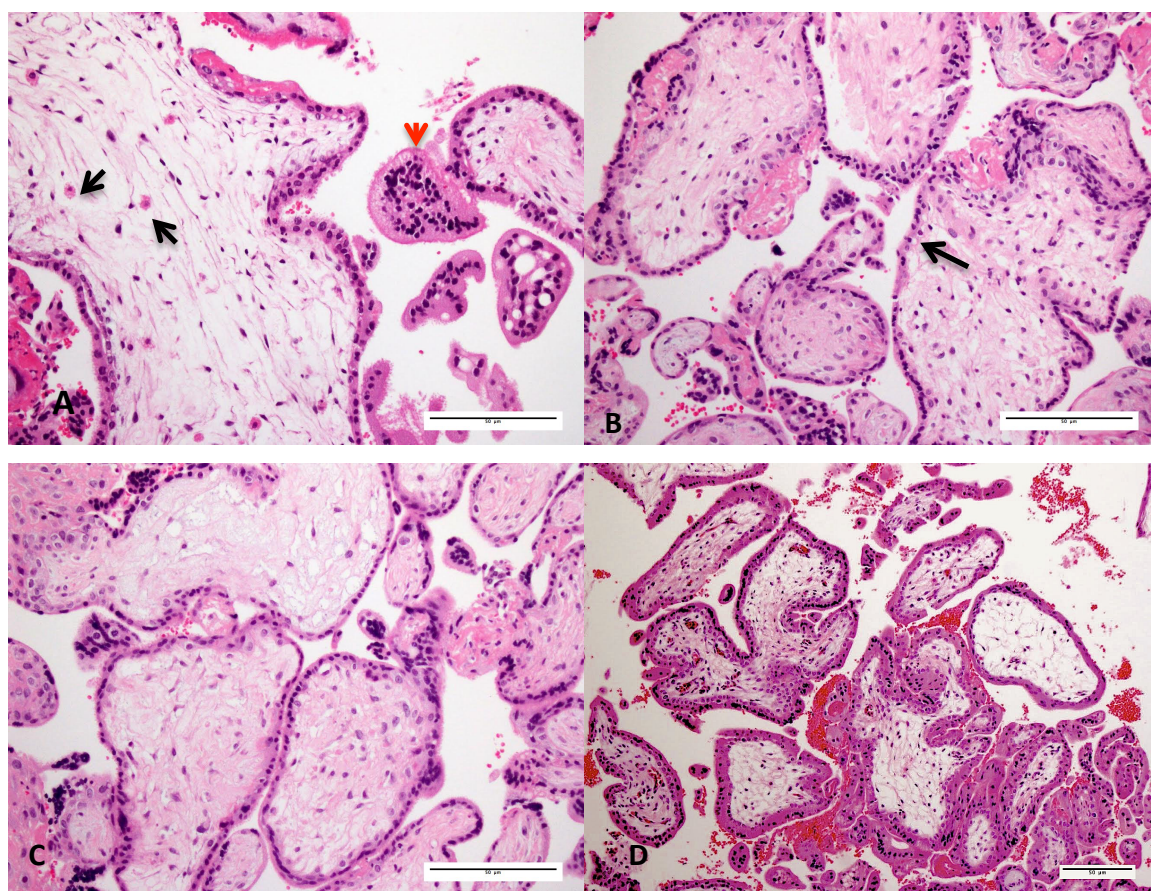


Figura 43. Microfotografías de placenta del primer trimestre. Predominio de vellosidades intermedias inmaduras. **A.** Vellosidad intermedia inmadura con estroma reticular en el que se aprecian canales estromales con células de Hofbauer en su interior (fechas negras). Se aprecian nudos sincitiales de proliferación vellositaria (flecha roja)). Tinción de hematoxilina eosina (20X). **B.** Las ramificaciones periféricas de las vellosidades intermedias inmaduras son vellosidades mesenquimales que carecen de vascularización. Tinción de hematoxilina eosina (20X). **C.** Vellosidades intermedias inmaduras en las que se aprecia una capa continua de sincitiotrofoblasto y una capa discontinua de citotrofoblasto. Tinción de hematoxilina eosina (20X). **D.** Vellosidades inmaduras intermedias con ramificaciones bulbosas con estroma

reticular. Tinción de hematoxilina eosina (10X). Imágenes cedidas por cortesía de la Dra. García (Hospital Universitario del Sureste de Arganda del Rey)) y del Dr. Panizo (Complejo Hospitalario de Navarra).

En los casos de mola hidatidiforme completa, se reconocieron las características que la definen histológicamente desde el primer trimestre (Baergen, 2011; Kurman et al., 2012; Sebire, 2010), tal y como se han descrito en la introducción, consistentes en hiperplasia del trofoblasto, atipia trofoblástica, cambios hidrópicos vellositarios, vasos vellositarios muy escasos, colapsados y vacíos, restos celulares por cariorrexis en el estroma vellositario, ramificaciones vellositarias irregulares y pseudoinclusiones, y ausencia de tejidos fetales (Figura 44).

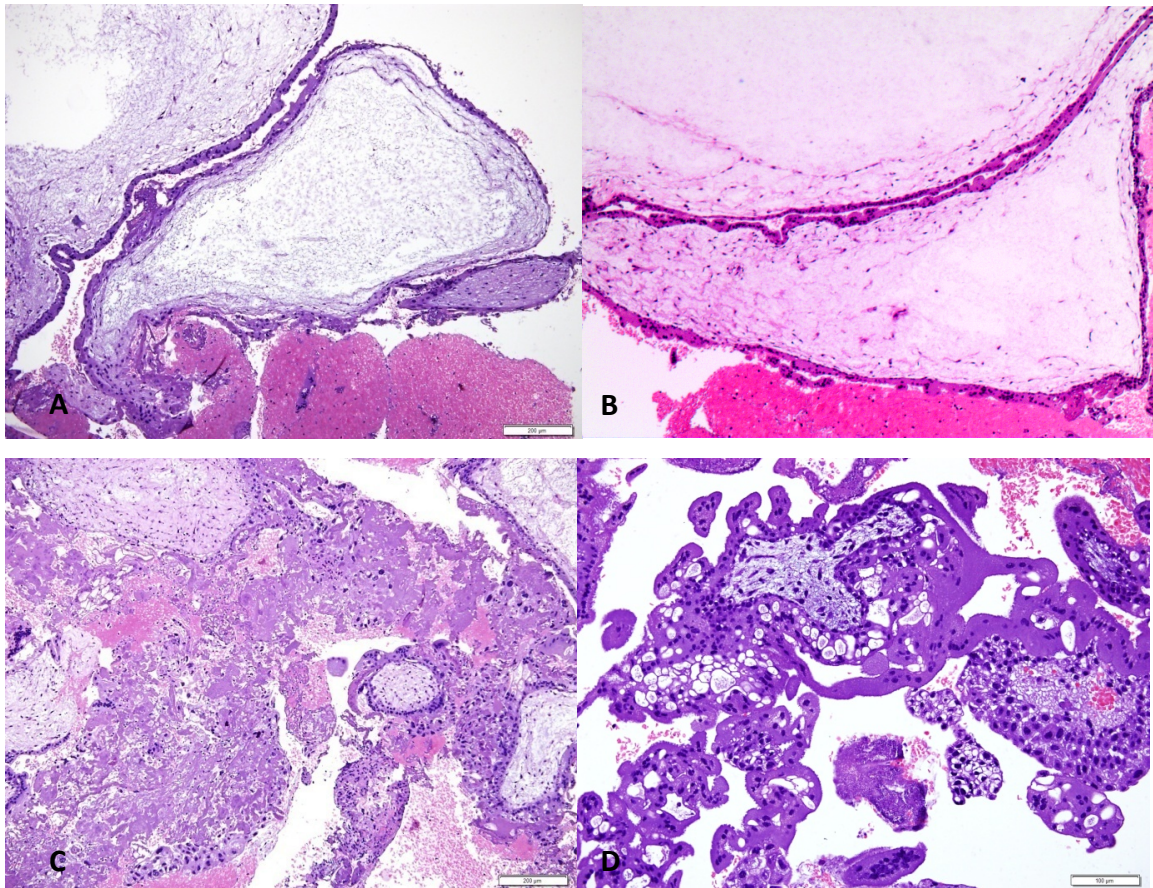


Figura 44. Microfotografías de mola hidatidiforme completa. **A.** Degeneración hidrópica vellositaria, con ausencia de vascularización vellositaria. Tinción de hematoxilina-eosina (10X). **B.** Cisternas en vellosidades de mola hidatidiforme completa. Tinción de hematoxilina-eosina (20X). **C.** Gran hiperplasia trofoblástica con atipia trofoblástica. Se aprecian vellosidades de tamaño aumentado. Tinción de hematoxilina-eosina (10X). **D.** Hiperplasia trofoblástica. Se aprecia pleomorfismo del trofoblasto y la vacuolización del citoplasma del sincitiotrofoblasto. Tinción de hematoxilina-eosina (20X). (Imágenes reconstruidas de las muestras obtenidas del Biobanco del Sistema Público de Andalucía, a través del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Virgen del Rocío).

En la revisión de casos de **molas parciales**, se evidenciaron las características histopatológicas compatibles con su diagnóstico ya en el primer trimestre (Baergen, 2011; Kurman et al., 2012; Sebire, 2010), tal y como se han descrito en la introducción consistentes en hiperplasia trofoblástica menos marcada que en la mola completa, cambios vellositarios hidrópicos leves o no tan generalizados como en las molas completas, disminución del número de vasos sanguíneos vellositarios, vellosidades festoneadas con pequeñas pseudoinclusiones, fibrosis del estroma vellositario y presencia de tejido fetal (Figura 45).

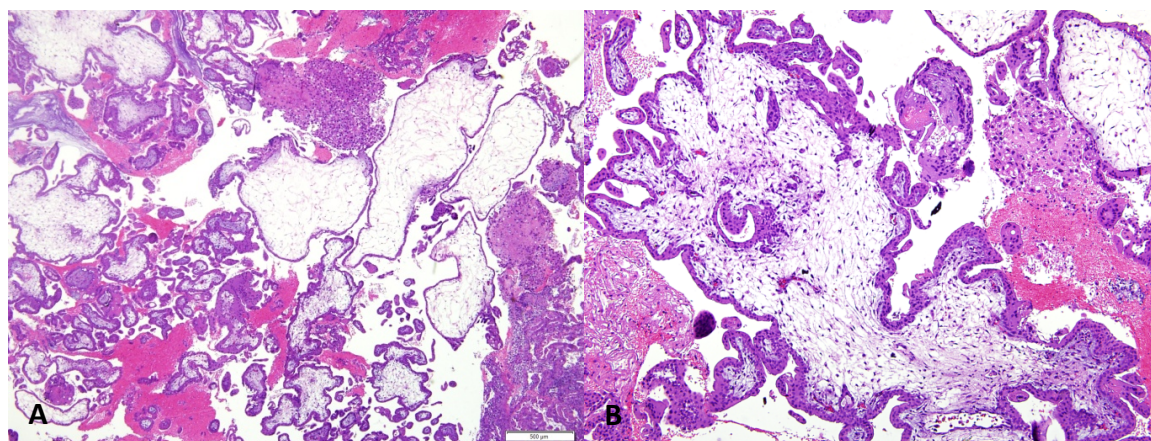


Figura 45. Microfotografía de mola hidatidiforme parcial. **A.** Se evidencian dos poblaciones vellositarias: unas con degeneración hidrópica y con cisternas estromales, y otra población vellositaria de características normales. Hiperplasia trofoblástica poco marcada. Tinción de hematoxilina-eosina (4X). **B.** Vellosidad festoneada propia de mola hidatidiforme parcial con pseudoinclusiones trofoblásticas. Presencia de vasos sanguíneos estromales. Tinción de hematoxilina-eosina (4X). (Imágenes reconstruidas de las muestras obtenidas del Biobanco del Sistema Público de Andalucía, a través del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Virgen del Rocío).

A continuación, se realizó la valoración de la tinción inmunohistoquímica de SP y RNK1, empleando para ello una escala semicuantitativa ya definida previamente en material y métodos.

3. EXPRESIÓN Y DISTRIBUCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA SP

Se ha observado que la distribución de SP en los distintos tipos celulares analizados en las muestras de mola a estudio, es fundamentalmente nuclear.

En la siguiente tabla, se resume la distribución de la tinción inmunohistoquímica de SP nuclearen las muestras estudiadas, valorada según la puntuación de Allred, observándose un predominio de las puntuaciones altas (por encima de 4), a nivel nuclear.

Puntuación Allred	Sincitio n (%)	Citotrof. n (%)	Fibrob. n (%)	Macróf. n (%)	Trof.int. n (%)	Decidua n (%)
0		2 (6,60%)		4 (13,30%)		
1						
2						
3					1 (3,30%)	
4	1 (3,30%)	1 (3,30%)	1 (3,30%)			
5	2 (6,60%)	5 (16,60%)	3 (10,00%)	4 (13,30%)	5 (16,60%)	
6	11 36,66%	13 (43,30%)	12 (40,00%)	15 (50,00%)	8 (26,66%)	2 (6,60%)
7	15 (50,00%)	7 (23,30%)	14 (46,60%)	7 (23,30%)	16 (53,33%)	26 (86,6%)
8	1 (3,30%)	2 (6,60%)				2 (6,60%)

Tabla 7. Valoración de expresión nuclear de SP en la tinción inmunohistoquímica. Sincitio: sincitiotrofoblasto. Citotrof: Citotrofoblasto. Fibrob: fibroblastos. Macróf: macrófagos. Endot: endotelio. Trof. int.: trofoblasto intermedio. Puntuación mediante método de Allred: 0-2: puntuación baja; 3-4: puntuación intermedia; 5-8: puntuación alta.

1.1 Sincitiotrofoblasto

Como puede observarse en la imagen, las células del sincitiotrofoblasto, presentan intensa expresión de SP a nivel nuclear, siendo las puntuaciones de Allred altas en el 96,6% de las muestras. (Figura 46).

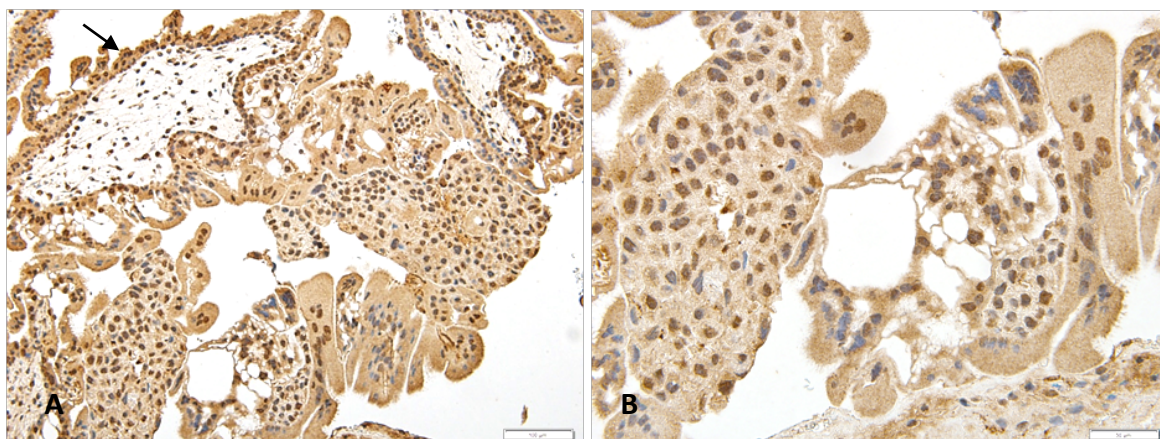


Figura 46. Inmunoreactividad de SP en mola hidatidiforme completa. **A.** Expresión de SP nuclear y en menor medida citoplasmática en citotrofoblasto (flecha negra), estroma (E) y sincitiotrofoblasto (S). Se aprecia hiperplasia del sincitiotrofoblasto característica (20X). **B.** Sincitiotrofoblasto (40X) con inmunorreactividad nuclear y en menor medida, citoplasmática a SP.

Se presentan a continuación en la tabla 8 los resultados de las puntuaciones de Allred obtenidas en las células de sincitiotrofoblasto.

Extensión	n, (%)	Intensidad	n, (%)	Allred	n, (%)
		0		0	
1		1	11 (36,6%)	1	
2		2	17 (56,6%)	2	
3	1 (3,3%)	3	2 (6,6%)	3	
4	5 (16,6%)			4	1 (3,3%)
5	24 (80%)			5	2 (6,6%)
				6	11 (38,4%)
				7	15 (50%)
				8	1 (3,3%)

Tabla 8. Puntuación Allred para valoración de expresión nuclear de SP en sincitiotrofoblasto.

Se observa menor expresión inmunohistoquímica de SP en los núcleos más atípicos del sincitiotrofoblasto, así como una mayor heterogeneidad en la tinción nuclear,

observándose acúmulos nucleares. También se aprecia de forma ocasional refuerzo a nivel de la membrana nuclear. Estos datos deberían comprobarse en estudios ulteriores a fin de intentar hallar una correlación entre estas diferencias de expresión de SP y posibles diferencias en parámetros clínicos, evolutivos o de clasificación que pudieran tener algún significado traslacional, pronóstico o terapéutico, entre otros (Figura 47)

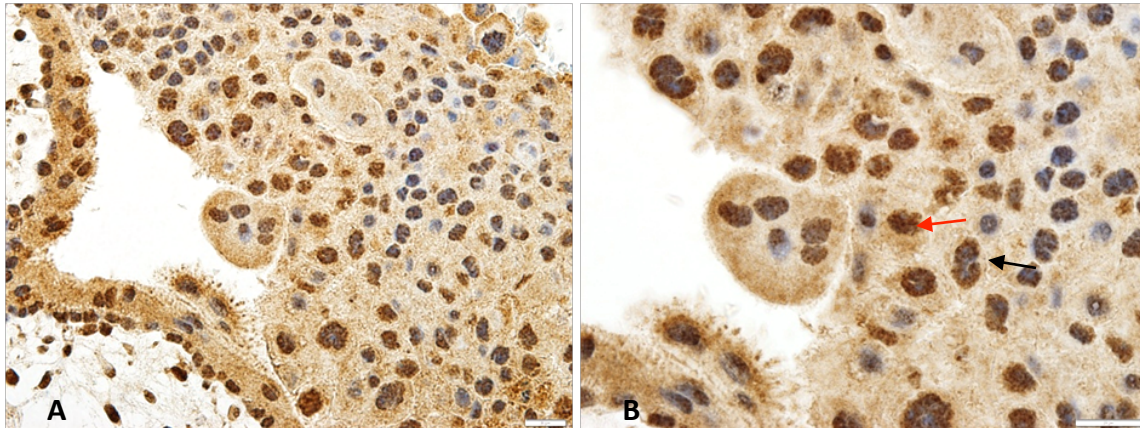


Figura 47. Expresión inmunohistoquímica de SP en sincitiotrofoblasto de mola completa. **A.** Sincitiotrofoblasto (60X) con tinción nuclear heterogénea de SP en núcleos con características de atipia. **B.** Detalle de sincitiotrofoblasto (100X) en el que se observan además de las tinciones nucleares heterogéneas, refuerzo de la tinción perinuclear (flecha negra), y agregados nucleares de SP (flecha roja). Se observan microvillis a nivel de nudo sincitial.

De igual modo se requiere completar y ampliar estudios de expresión para concretar si es o no significativa esta diferencia de expresión en este tipo morfológico celular concreto, así como en los núcleos que se observan en los nudos sincitiales, que en su mayoría no presentan expresión de SP (Figura 48).

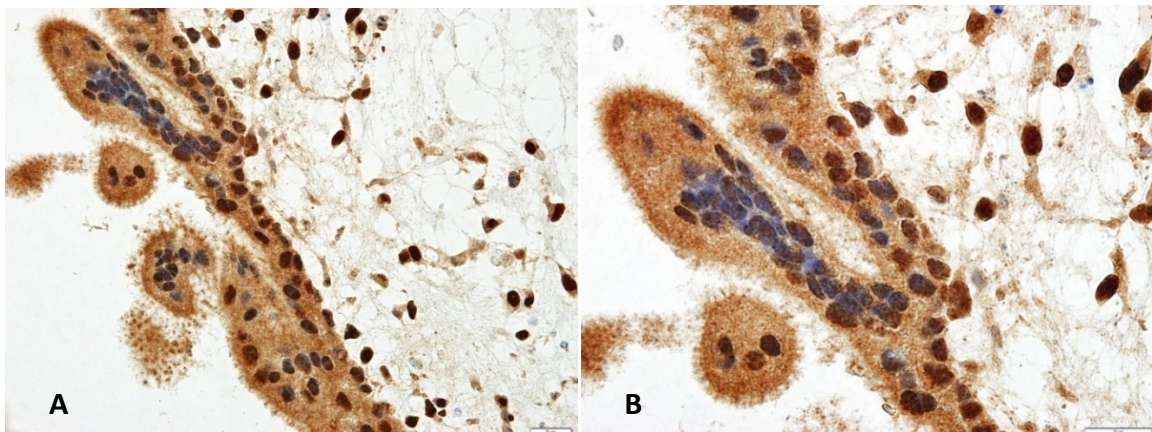


Figura 48. A. Expresión inmunohistoquímica de SP en brote sincitial en mola completa (60X), con menor expresión inmunohistoquímica de SP nuclear que la inmunoreactividad habitual para el sincitiotrofoblasto.

B. Brote sincitial e inmunoreactividad positiva de SP en citotrofoblasto en núcleo y en menor medida a nivel citoplasmático (100X). En el estroma vellositario se aprecia una clara expresión nuclear de SP a nivel de los fibroblastos.

Además de la clara expresión nuclear, a nivel citoplasmático en las células del sincitiotrofoblasto, se pudo evidenciar expresión de SP valorada con tinciones de Allred de 5-6, con puntuaciones de tinción débil-intermedia en todos los casos.

1.2 Citotrofoblasto

En las células del citotrofoblasto, se ha observado expresión de SP positiva a nivel nuclear, con puntuaciones altas de Allred en el 90% de los casos.

Se aprecia tinción nuclear predominantemente en la capa más basal de las células del citotrofoblasto, en contacto con el estroma de la vellosidad, dato que podría tener relación con la capacidad replicativa/proliferativa vs. diferenciadora, de los estratos basales celulares así como con su mayor actividad metabólica. Este es otro dato que puede orientar a estudios posteriores para comparar si existe correlación entre parámetros de actividad metabólica de estas células con los distintos patrones de expresión de SP nuclear (Fig 49).

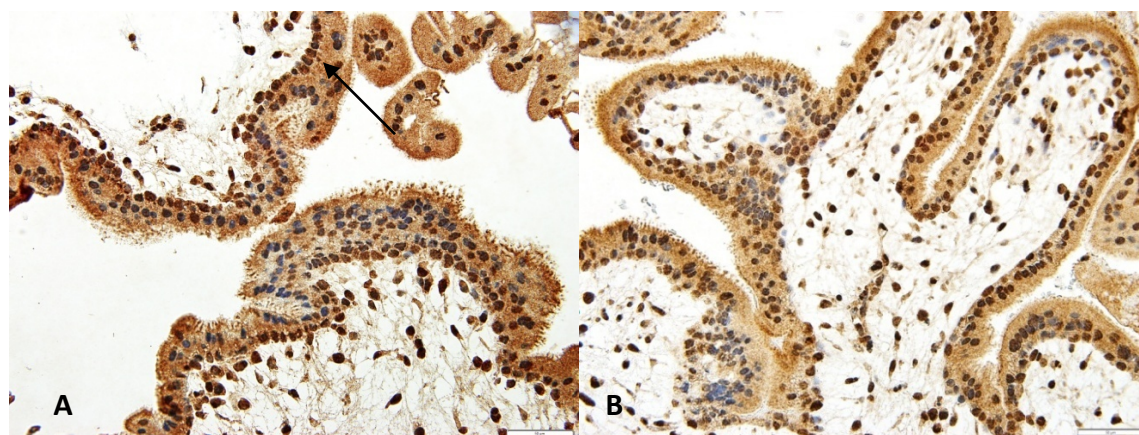


Figura 49. A Expresión inmunohistoquímica de SP en citotrofoblasto y estroma vellositario (40X). Se aprecia mayor inmunoreactividad nuclear de la capa interna de células del citotrofoblasto (flecha negra). En el estroma, la expresión en los fibroblastos es predominantemente nuclear. B. Vellosidades de mola completa (40X). Expresión de SP de predominio nuclear en células estromales.

Los resultados de la valoración Allred de la expresión nuclear de SP en este tipo celular se muestran a continuación (Tabla 9).

Extensión	n, (%)	Intensidad	n, (%)	Allred	n, (%)
0	2 (6,6%)	0	2 (6,6%)	0	2 (6,6%)
1		1	9 (30,0%)	1	
2		2	16 (53,3%)	2	
3	1 (3,3%)	3	3 (10,0%)	3	
4	16 (53,3%)			4	1 (3,3%)
5	11 (36,6%)			5	5 (16,6%)
				6	13 (43,3%)
				7	7 (23,3%)
				8	2 (6,6%)

Tabla 9. Puntuación Allred para valoración de expresión nuclear de SP en citotrofoblasto.

También se ha observado expresión citoplasmática de SP en el citotrofoblasto con puntuaciones de tinción elevadas de Allred (6-7), con intensidad de tinción intermedia en todos los casos.

1.3 Fibroblastos

Los fibroblastos del estroma vellositario presentan predominantemente expresión positiva de SP nuclear con una valoración de tinción alta según el método de Allred, en el 96,6 % de los casos. (Figura 50)

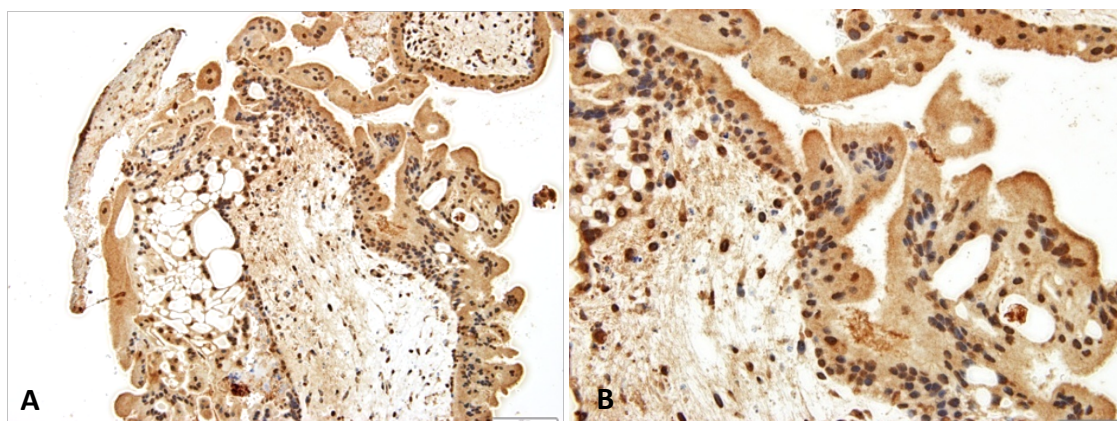


Figura 50. A. Vellosidad de mola completa con sincitiotrofoblasto con degeneración vacuolar (20X). Se aprecia estroma con fibroblastos con inmunoreactividad fundamentalmente nuclear de SP. B. Estroma vellositario con fibroblastos. Citotrofoblasto y brotes sincitiales (40X).

Las puntuaciones de Allred para la expresión nuclear de los fibroblastos vellositarios se detallan a continuación en la Tabla 10.

Extensión	n, (%)	Intensidad	n, (%)	Allred	n, (%)
1		1	13 (43,3%)	1	
2		2	16 (53,3%)	2	
3	2 (6,6%)	3		3	
4	4(13.3%)			4	1 (3,3%)
5	24(80%)			5	3 (10%)
				6	12 (40%)
				7	14 (46,6%)
				8	

Tabla 10. Puntuación Allred para valoración de expresión nuclear de SP en fibroblastos.

Asimismo, las puntuaciones para evaluación de la expresión citoplasmática de la SP en los fibroblastos son positivas con Allred de 5-6, con intensidad de tinción débil/intermedia y extensión alta en todos los casos.

1.4 Macrófagos

En las células macrofágicas o células de Hofbauer, se ha observado un patrón de expresión predominante nuclear de SP con puntuaciones de tinción alta en el 83,3% de los casos. (Figura 51).

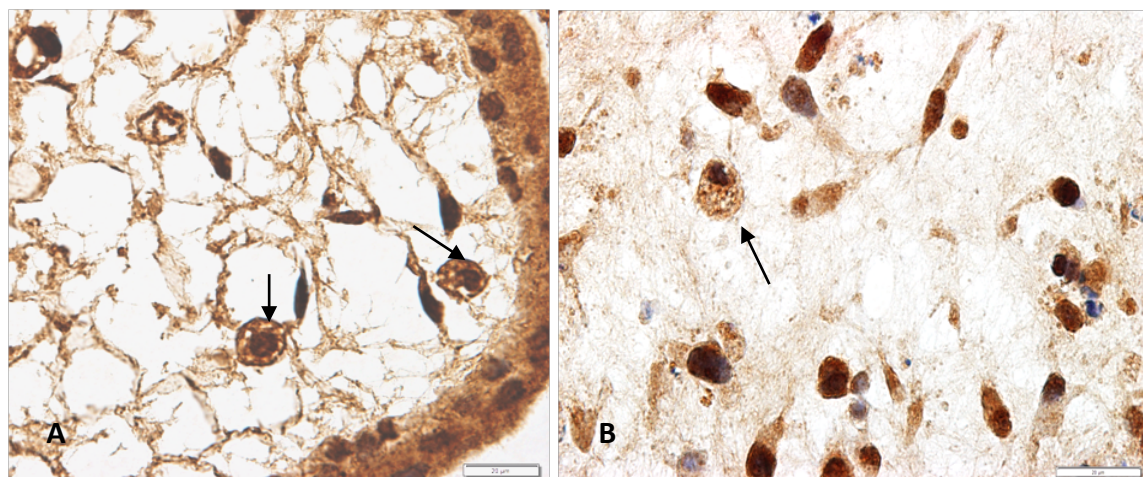


Figura 51. A: Expresión de SP en fibroblastos estromales. Expresión nuclear de SP en macrófagos con citoplasma reticulado (flechas) (60X). **B:** Inmunoreactividad nuclear positiva de SP en macrófago (flecha), con expresión de SP en granulaciones citoplasmáticas (100X)

En la Tabla 11, se describe la puntuación Allred para este tipo celular.

Extensión	n, (%)	Intensidad	n, (%)	Allred	n, (%)
0	4 (13,3%)	0	4 (13,3%)	0	4 (13,3%)
1		1	15 (50%)	1	
2		2	11 (36,6%)	2	
3	1 (3,33%)	3		3	
4	4 (13,3%)			4	
5	21 (70%)			5	4 (13,3%)
				6	15 (50%)
				7	7 (23,3%)
				8	

Tabla 11. Puntuación Allred para valoración de expresión nuclear de SP en los macrófagos.

A pesar de la intensa expresión de SP a nivel nuclear en los macrófagos, las puntuaciones de Allred para la expresión citoplasmática de SP en estas células, son positivas con Allred de 4-6, con intensidad débil/intermedia en todos los casos.

1.5 Células endoteliales

Las estructuras vasculares en las vellosidades de la mola hidatidiforme, son de difícil identificación dado que esta patología placentaria se caracteriza por la falta de desarrollo de la vascularización capilar vellositaria. Por este motivo, no se realizó valoración de SP de células endoteliales.

1.6 Trofoblasto intermedio

La expresión de SP nuclear a nivel del trofoblasto intermedio presenta puntuaciones altas de Allred en el 96,6% de los casos. (Figura 52)

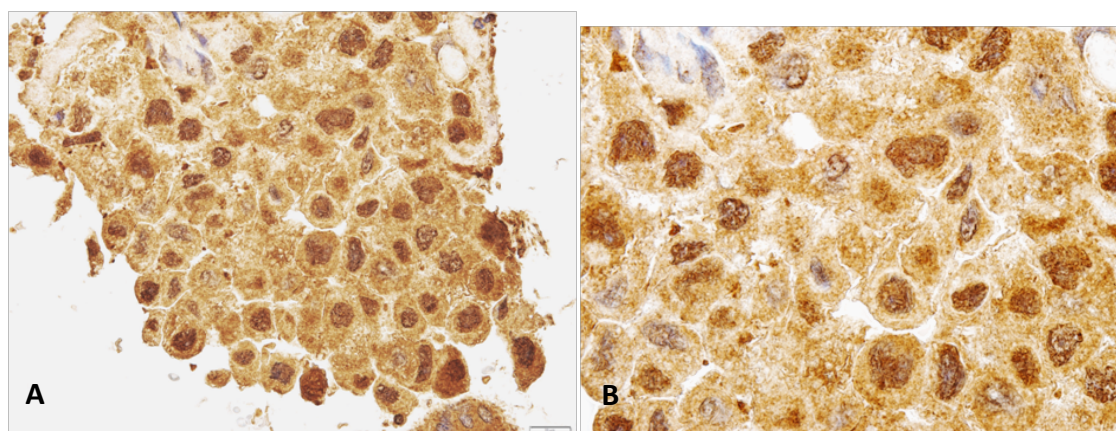


Figura 52. A y B. Inmunoreactividad nuclear y citoplasmática de SP en trofoblasto intermedio (60X, 100X).

El resumen de puntuaciones de Allred en el trofoblasto intermedio, se encuentra en la Tabla 12.

Extensión	n, (%)	Intensidad	n, (%)	Allred	n, (%)
0		0		0	
1		1	12 (40%)	1	
2	1 (3,3%)	2	18 (60%)	2	
3		3		3	1 (3,3%)
4	8 (26,6%)			4	
5	21 (70%)			5	5 (16,6%)
				6	8 (26,6%)
				7	16 (53,3%)
				8	

Tabla 12. Puntuación Allred para valoración de expresión nuclear de SP en el trofoblasto intermedio.

A pesar del predominio de expresión nuclear, la expresión citoplasmática de SP en el trofoblasto intermedio, ha sido valorada en puntuaciones de Allred, como positivas altas (6-7) en el 100% de los casos, con intensidad de tinción intermedia de forma generalizada.

1.7 Decidua

El tejido decidual presenta puntuaciones de tinción inmunohistoquímica muy altas (Allred de 6-8) a nivel nuclear en todas las muestras al igual que el resto de tipos celulares estudiados (Figura 53).

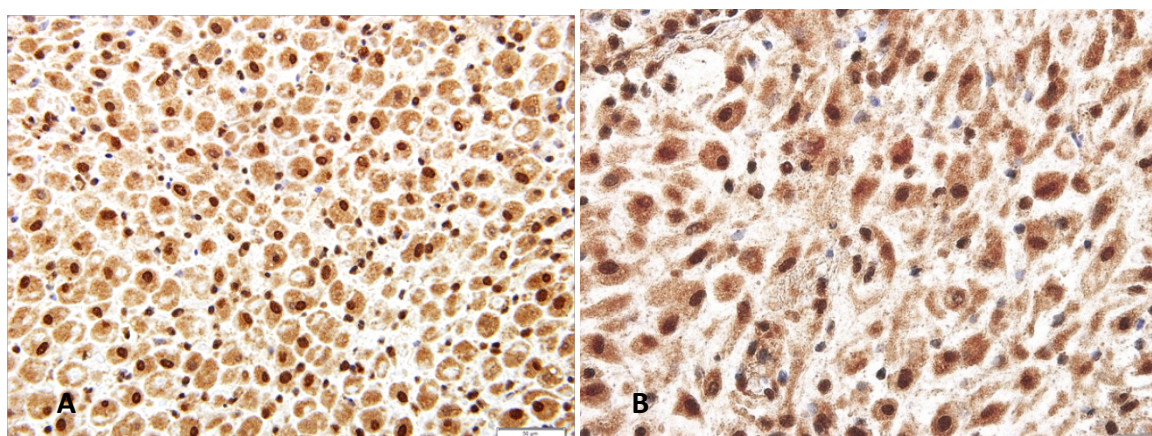


Figura 53. A y B. Células deciduales (40X, 60X), que expresan inmunoreactividad positiva en núcleo con tinción intensa y en citoplasma con menor intensidad.

En la Tabla 13 se detallan las puntuaciones de Allred para la expresión nuclear de SP.

Extensión	n, (%)	Intensidad	n, (%)	Allred	n, (%)
0		0		0	
1		1	2 (6,6%)	1	
2		2	26 (86,6%)	2	
3		3	2 (6,6%)	3	
4				4	
5	30 (100%)			5	
				6	2 (6,6%)
				7	26 (86,6%)
				8	2 (6,6%)

Tabla 13. Puntuación Allred para valoración de expresión nuclear de SP en las células deciduales

También se ha observado a nivel citoplasmático en las células del tejido decidual, expresión citoplasmática de SP con puntuación de Allred alta (5-7), con intensidad de tinción intermedia, en todos los casos.

4. EXPRESIÓN Y DISTRIBUCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DEL RNK1

Se ha observado que la distribución de RNK1 en los tipos celulares de la mola hidatidiforme humana, es fundamentalmente citoplasmática.

La distribución de RNK1 en la tinción inmunohistoquímica de las 30 muestras es de predominio citoplasmático traduciendo puntuaciones altas de Allred en todos los tipos celulares (Tabla 14).

Puntuación Allred	Sincitio. n (%)	Citotrof. n (%)	Fibrob. n (%)	Macróf. n (%)	Trof.Int. n (%)	Decidua n (%)
0						
1						
2						
3						
4		1 3,30%				
5					8 26,60%	
6	4 13,30%	5 16,60%	15 50%	15 50%	14 46,60%	4 13,30%
7	12 40%	11 36,60%	14 46,60%	13 43,30%	8 26,60%	18 60%
8	14 46,60%	13 43,30%	1 3,30%	2 6,60%		8 26,60%

Tabla 14. Valoración de expresión citoplasmática de RNK1 en la tinción inmunohistoquímica. Sincitio: sincitiotrofoblasto. Citotrof: Citotrofoblasto. Fibrob: fibroblastos. Macróf: macrófagos. Trof. Int: trofoblasto intermedio. Puntuación mediante método de Allred: 0-2: puntuación baja; 3-4: puntuación intermedia; 5-8: puntuación alta.

1.8 Sincitiotrofoblasto

La expresión de RNK1 en las células del sincitiotrofoblasto, es fundamentalmente citoplasmática con valoraciones de tinción Allred intensas (6-8) en todos los casos. (Figura 54).

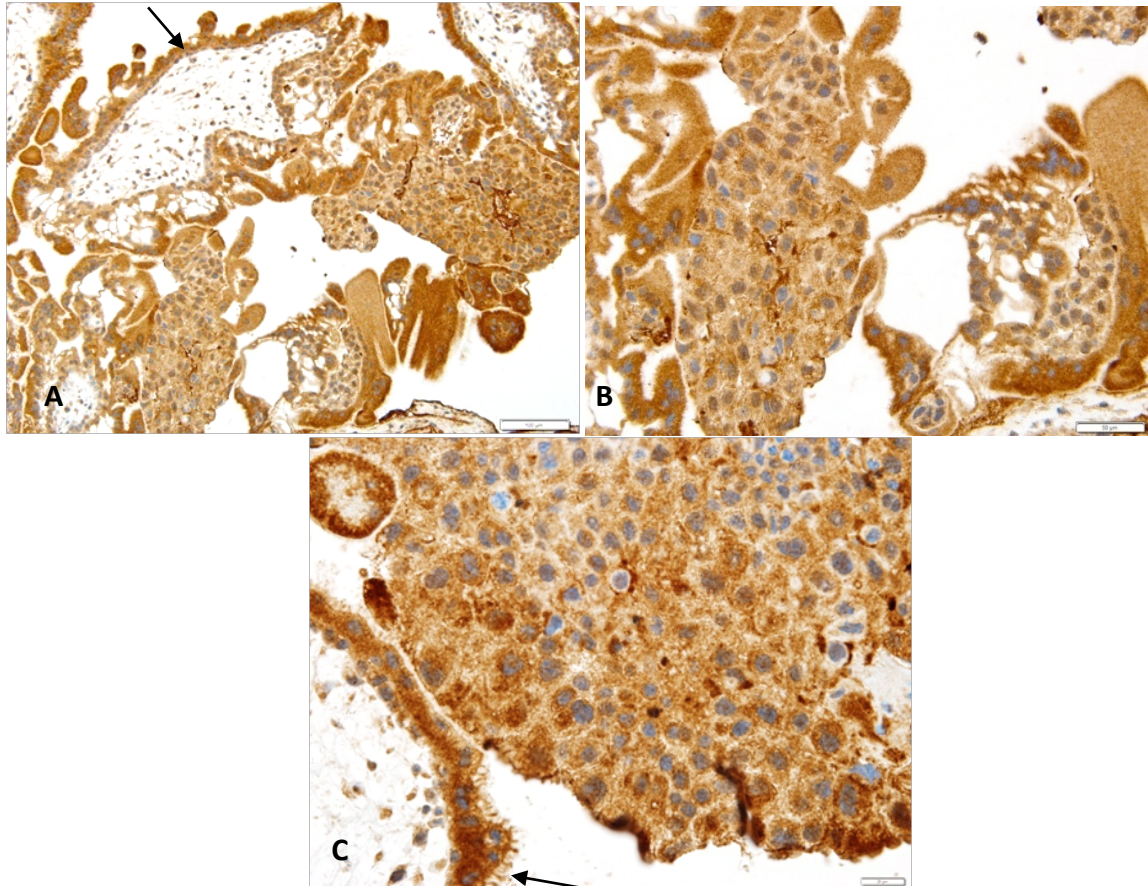


Figura 54. Inmunoreactividad de RNK1 en mola hidatidiforme completa. **A.** Expresión de RNK1 en citotrofoblasto (flecha negra), estroma (E) y sincitiotrofoblasto (S) de predominio citoplasmático con tinción intensa. Se aprecia hiperplasia del sincitiotrofoblasto característica (20X). **B y C.** Sincitiotrofoblasto y citotrofoblasto (flecha) (40X) con inmunoreactividad citoplasmática a RNK1.

Se resumen en la Tabla 15, las puntuaciones de Allred de expresión de RNK1 en las células del sincitiotrofoblasto.

Extensión	n, (%)	Intensidad	n, (%)	Allred	n, (%)
0		0		0	
1		1	4 (13,3%)	1	
2		2	12 (40%)	2	
3		3	14 (46,6%)	3	
4				4	
5	30 (100%)			5	
				6	4 (13,3%)
				7	12 (40%)
				8	14 (46,6%)

Tabla 15. Puntuación Allred para valoración de expresión citoplasmática de RNK1 en el sincitiotrofoblasto.

1.9 Citotrofoblasto

Se ha observado igualmente que la expresión de RNK1 es fundamentalmente citoplasmática con valoraciones de tinción altas (6-8) en el 96,6% de los casos (20/30) en las células del citotrofoblasto (Figura 55).

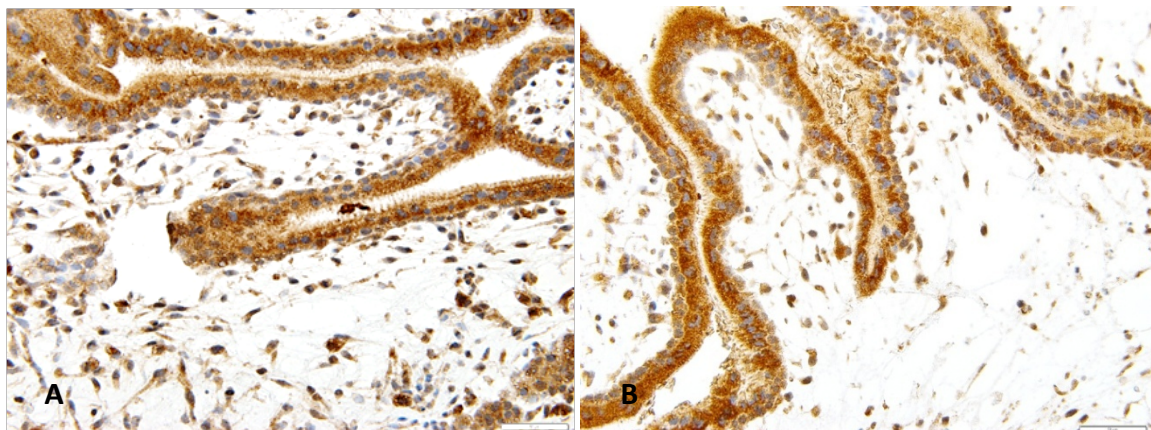


Figura 55. Vellosoidad de mola completa. **A y B.** Expresión citoplasmática de RNK1 en citotrofoblasto con tinción inmunohistoquímica intensa y en fibroblastos del estroma (40X)

Los datos de valoración de Allred de las células del citotrofoblasto, están recogidos en la siguiente tabla (Tabla 16).

Extensión	n, (%)	Intensidad	n, (%)	Allred	n, (%)
0		0		0	
1		1	6 (20%)	1	
2		2	11 (36,6%)	2	
3	1 (3,3%)	3	13 (43,3%)	3	
4				4	1 (3,3%)
5	29 (96,6%)			5	
				6	5 (16,6%)
				7	11 (36,6%)
				8	13 (43,3%)

Tabla 16. Puntuación Allred para valoración de expresión citoplasmática de RNK1 en el citotrofoblasto

1.10 Fibroblastos

En las células fibroblásticas del estroma vellositario, la expresión de RNK1 es fundamentalmente citoplasmática con valoraciones de tinción intensas (6-8) en todos los casos (Figura 56).

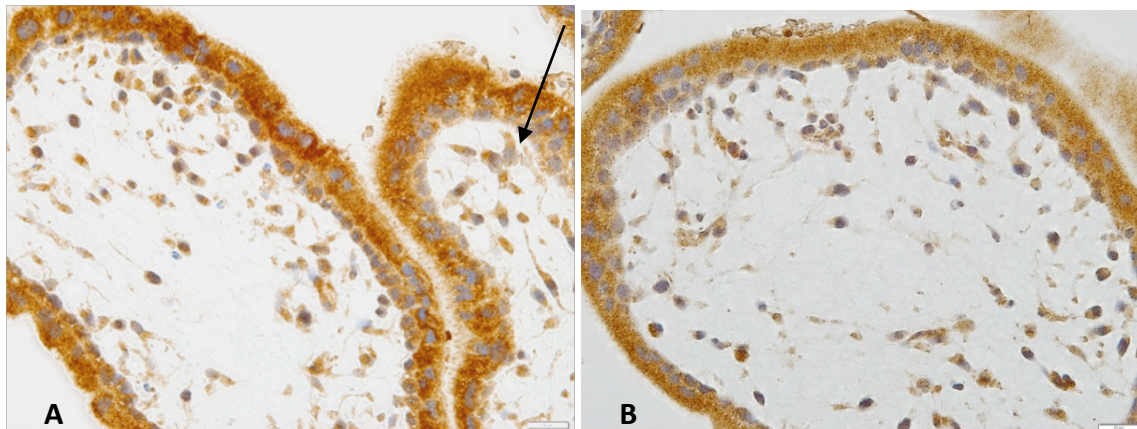


Figura 56. Ay B. Estroma de vellosidad de mola completa con inmunoreactividad citoplasmática positiva a RNK1 y expresión negativa nuclear (flecha negra) (60X).

A continuación se presenta la Tabla 17, con el resumen de puntuaciones Allred para la expresión de RNK1 citoplasmático en los fibroblastos.

Extensión	n, (%)	Intensidad	n, (%)	Allred	n, (%)
0		0		0	
1		1	15 (50%)	1	
2		2	14 (46,6%)	2	
3		3	1 (3,3%)	3	
4				4	
5	30 (100%)			5	
				6	15 (50%)
				7	14(46,6%)
				8	1 (3,3%)

Tabla 17. Puntuación Allred para valoración de expresión citoplasmática de RNK1 en los fibroblastos vellositarios

1.11 Macrófagos

Se ha observado una clara inmunoreactividad positiva para RNK1 con puntuaciones de tinción altas (6-8) a nivel citoplasmático en las células de Hofbauer (células macrofágicas) en todos los casos (Figura 57).

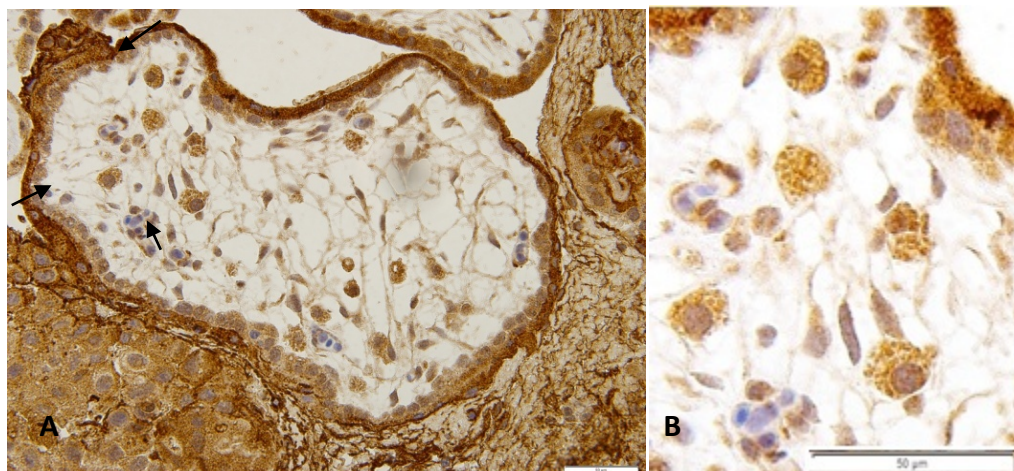


Figura 57. Vellosidad de mola parcial y sincitiotrofoblasto (S) **A.** Expresión citoplasmática de RNK1 en macrófagos (flechas) con menor expresión nuclear (40X). **B.** Detalle de macrófagos y células estromales con inmunoreactividad a RNK1 de predominio citoplasmático (40x).

Las valoraciones de Allred para la célula de Hofbauer son las siguientes que se resumen en la Tabla 18.

Extensión	n, (%)	Intensidad	n, (%)	Allred	n, (%)
0		0		0	
1		1	15 (50%)	1	
2		2	13 (46,6%)	2	
3		3	2 (6,6%)	3	
4				4	
5	30 (100%)			5	
				6	15 (50%)
				7	13 (46,6%)
				8	2 (6,6%)

Tabla 18. Puntuación Allred para valoración de expresión citoplasmática de RNK1 en los macrófagos.

Además de esta predominante expresión citoplasmática de RNK1, también se ha evidenciado expresión nuclear de RNK1 (Allred 4-6), con intensidad de tinción intermedia en todos los casos.

1.12 Células endoteliales

En el caso de las células endoteliales, al igual que hemos comentado con la tinción IHQ para SP, la valoración de la inmunorreactividad citoplasmática para RNK1 se ve dificultada por la propia histología de la patología a estudio, por lo que no pudo ser evaluada.

1.13 Trofoblasto intermedio

En las células del trofoblasto intermedio, la expresión de RNK1 es de claro predominio citoplasmático con puntuaciones de Allred altas entre 5 y 7, observándose en algunos casos refuerzo de membrana celular con intensidad de tinción débil (Allred de 3-4) en todos los casos (Figura 58).

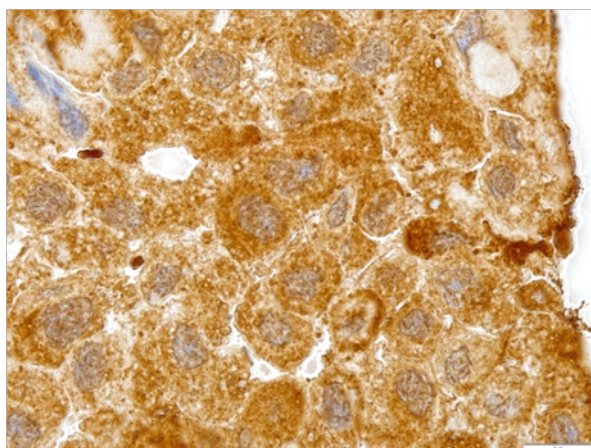


Figura 58. Inmunoreactividad citoplasmática y nuclear positiva a RNK1 en trofoblasto intermedio, con refuerzo de membrana celular (100X).

Se resumen a continuación la valoración inmunohistoquímica de la expresión citoplasmática de RNK1 de las células del trofoblasto intermedio según el método Allred. (Tabla 19).

Extensión	n, (%)	Intensidad	n, (%)	Allred	n, (%)
0		0		0	
1		1	8 (26,6%)	1	
2		2	14 (46,6%)	2	
3		3	8 (26,6%)	3	
4				4	
5	30 (100%)			5	
				6	8 (26,6%)
				7	14(46,6%)
				8	8 (26,6%)

Tabla 19. Puntuación Allred para valoración de expresión citoplasmática de RNK1 en el trofoblasto intermedio.

1.14 Decidua

Las células que constituyen el tejido decidual presentan un patrón de expresión fundamentalmente citoplasmático con puntuaciones de Allred entre 6 y 8 en todos los casos, igual que el resto de tipos celulares y tejidos descritos anteriormente (Figura 59).

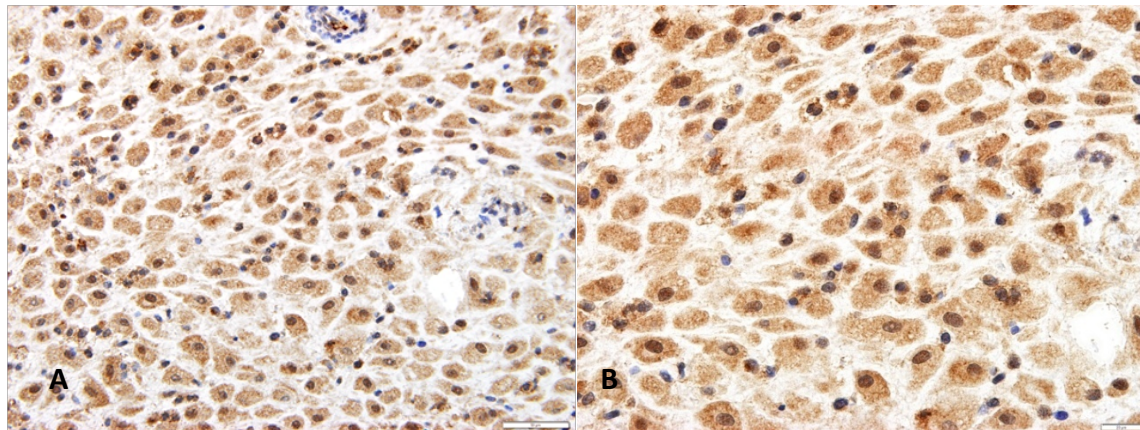


Figura 59. A y B. Expresión citoplasmática y nuclear de RNK1 a nivel de la decidua (40X, 60X).

Los resultados de la valoración Allred de la expresión citoplasmática de RNK1 en este tipo celular se muestran a continuación (Tabla 20).

Extensión	n, (%)	Intensidad	n, (%)	Allred	n, (%)
0		0		0	
1		1	4 (13,3%)	1	
2		2	18 (60%)	2	
3		3	8 (26,6%)	3	
4				4	
5	30 (100%)			5	
				6	4 (13,3%)
				7	18(60%)
				8	8 (26,6%)

Tabla 20. Puntuación Allred para valoración de expresión citoplasmática de RNK1 en las células deciduales

En las células deciduales, se valoró expresión nuclear de RNK1 con puntuaciones de Allred positivas altas (6-7) en todos los casos, con intensidad de tinción intermedia.

5. CONTROL NEGATIVO

La figura 60 muestran imágenes de los controles negativos (muestras en las que no se ha añadido el anticuerpo primario) realizados como control de calidad de técnica y especificidad de los anticuerpos en las muestras de mola hidatidiforme utilizadas para este trabajo, tal y como se ha especificado en material y métodos.

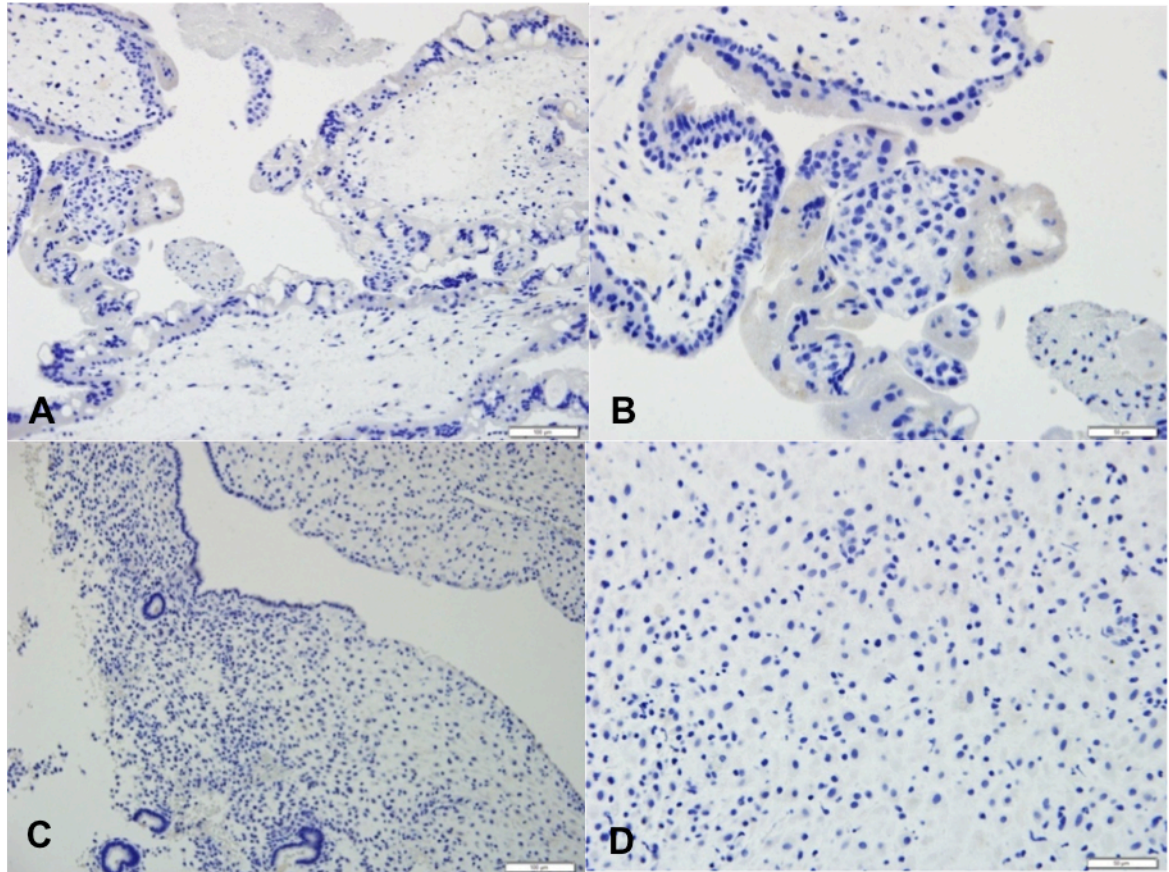


Figura 60. Imágenes de control negativo. **A.** Vellosidades con hipertrofia del sincitiotrofoblasto que aparece vacuolado (20x). **B.** Detalle de células estromales, con célula endotelial (asterisco) y macrófago (flecha), y fibroblastos. Células del citotrofoblasto y sincitiotrofoblasto (40x). **C.** Células deciduales (20x). **D.** Células deciduales (40x).

6. RESUMEN DE LOS RESULTADOS

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Se han valorado los legrados por aspiración de una muestra de 30 pacientes con edad media de 32 años, en su mayoría de origen caucásico, con una paridad media de 2,46 gestaciones.

La clínica de presentación fue predominantemente metrorragia del primer trimestre, con una edad gestacional media al diagnóstico de 9 semanas.

El diagnóstico ecográfico de sospecha de mola estuvo presente en el 66% de los casos. De las 20 pacientes a las que se les realizó hCG sérica previa al tratamiento, el 50% presentaron cifras de hCG por encima de 100.000 mU/mL.

En todos los casos se realizó tratamiento ante la sospecha de aborto con o sin sospecha de gestación molar, mediante legrado por aspiración, tras lo que se llegó al diagnóstico anatomopatológico (estudio morfológico y expresión de proteína p57 en todos los casos, y cariotipo mediante técnica de FISH en 8 casos) de mola parcial en 8 casos y mola completa en 22 casos.

Hubo 3 pérdidas de seguimiento de pacientes, con tiempo medio de negativización de hCG sérica de 50 días tras la evacuación molar. Sólo una paciente requirió tratamiento quimioterápico por presentar criterios de ETG persistente sin extensión metastásica, que evolucionó hacia la resolución del proceso tras finalizar tratamiento.

EXPRESIÓN Y DISTRIBUCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE SP

Se ha observado que la expresión inmunohistoquímica de SP es fundamentalmente de predominio nuclear habiendo sido evaluada la inmunoreactividad de la tinción con puntuaciones altas por el método Allred de forma mayoritaria en todos los tipos celulares tanto de la mola (sincitiotrofoblasto, citotrofoblasto, fibroblastos y macrófagos), como en la decidua y el trofoblasto intermedio.

Las células endoteliales no han sido valoradas debido al escaso desarrollo capilar vellositario propio de esta patología placentaria.

A nivel del sincitiotrofoblasto se han evidenciado diversos hallazgos en la expresión de SP nuclear: heterogenicidad en la tinción nuclear en las células que manifiestan mayor

atipia nuclear, acúmulos nucleares de SP, refuerzo ocasional de la membrana nuclear y menor expresión en los núcleos de los nudos sincitiales.

Estos datos requerirían nuevos estudios con la finalidad de hallar una correlación entre estas características en la expresión de SP y posibles diferencias en parámetros clínicos, evolutivos o de clasificación que pudieran tener algún significado traslacional, pronóstico o terapéutico.

En cuanto a las observaciones realizadas a nivel del citotrofoblasto, destaca la tinción nuclear predominantemente en la capa más basal de las células del citotrofoblasto, dato que podría tener relación con la capacidad proliferativa vs. diferenciadora, de los estratos basales celulares así como con su mayor actividad metabólica, y que habría que correlacionar en estudios futuros.

La expresión citoplasmática de SP ha sido valorada con puntuaciones de intensidad de tinción débil/ intermedia en extensiones altas en todos los tipos celulares descritos.

EXPRESIÓN Y DISTRIBUCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE RNK1

La expresión inmunohistoquímica de RNK1 es de predominio fundamentalmente citoplasmático, siendo valorada la inmunorreactividad de la tinción inmunohistoquímica con puntuaciones altas por el método Allred de forma mayoritaria en todos los tipos celulares de la mola y (sincitiotrofoblasto, citotrofoblasto, fibroblastos y macrófagos), y en la decidua y el trofoblasto intermedio.

Las células endoteliales no han sido valoradas por el escaso desarrollo capilar vellositario que caracteriza a la mola hidatidiforme.

Se han evidenciado expresión nuclear de RNK1 en, macrófagos y decidua, con valoraciones de tinción intermedia en extensiones altas de estas poblaciones celulares, en todos los casos.

V. DISCUSIÓN

La SP es un neuropéptido perteneciente a la familia de las TK que ejerce funciones de neurotransmisor, y que se ha descrito tanto a nivel de SNC como a nivel periférico, fundamentalmente a nivel de neuronas primarias sensitivas.

No obstante, también ha sido descrita la distribución de la SP y del RNK1 en otras poblaciones celulares no neuronales como las células inmunes (Ho et al., 1997; Metwali et al., 2004; Weinstock, 2004; Weinstock, Blum, Walder, & Walder, 1988), las células endoteliales (Linnik & Moskowitz, 1989), células de Leydig (Chiwakata et al., 1991) o parénquima ovárico no innervado (Debeljuk, 2006), a nivel sérico (Pernow, 1983), y en órganos no innervados como la placenta (Graf et al., 1996; Marzioni et al., 2005; Munoz, Carranza, Pavon, Anderson, & Covenas, 2013; Munoz, Pavon, et al., 2010; Sastry, Tayeb, Barnwell, Janson, & Owens, 1981).

Describimos en nuestro trabajo por primera vez, la inmunolocalización de SP y RNK1 en otro tejido no innervado que es la mola hidatidiforme humana.

Estos hallazgos, suponen un cambio en el concepto clásico de la localización de los NP únicamente a nivel de las sinapsis químicas neuronales bien en el SNC o a nivel periférico en neuronas aferentes primarias o terminaciones nerviosas sensitivas en los distintos órganos (Maggi & Meli, 1988). Por tanto, existen otras vías de actuación para que las TK ejerzan sus funciones biológicas además de la neurotransmisión, de modo paracrino en los tejidos periféricos, o participando en la regulación de los ejes endocrinos.

La mola hidatidiforme humana es una alteración de la gestación, conceptualmente encuadrada en el momento actual como una de las cuatro entidades clinicopatológicas que constituyen la ETG. La ETG comprende un espectro de procesos malignos y benignos poco frecuentes, derivados de una proliferación anormal de la placenta humana (hiperplasia) como consecuencia de una fecundación anormal con un exceso de dotación del genoma paterno y una contribución materna ocasional. Incluye los trastornos del desarrollo placentario como la alteración de la fertilización (mola hidatidiforme completa, mola parcial y la mola invasiva), coriocarcinoma, el tumor trofoblástico del sitio placentario (TTSP) y lesiones derivadas del trofoblasto coriónico.

La SP es ubicua en el organismo y a concentración pM regula múltiples funciones fisiológicas. Existen datos publicados sobre niveles plasmáticos de la SP de controles sanos adultos en diversos estudios sobre sepsis y shock séptico, sobre lesión pulmonar por gas

mostaza, sobre displasia de cadera o hemiplejía alternante entre otros, en los que la concentración sérica de este NP es pM en todos ellos (Arnalich et al., 1995; Beer et al., 2002; Inui et al., 2012; Najafian et al., 2014; H. Wang et al., 2014). Han sido determinadas recientemente, las concentraciones séricas en muestras extraídas de cordón umbilical de SP en recién nacidos a término sanos encontrando igualmente valores en rango de concentración pM (Bueno, 2014). Sin embargo, a concentración nM, es decir, a concentración patológica, la SP estaría regulando numerosos procesos fisiopatológicos, induciendo la proliferación celular en las células tumorales, como se ha comprobado en cultivos celulares de múltiples tumores como en el neuroblastoma, glioma, retinoblastoma, melanoma u osteosarcoma entre otros (Munoz, Berger, et al., 2014; Munoz et al., 2008; Munoz et al., 2007; Munoz, Rosso, Perez, Covenas, Rosso, Zamarriego, & Piruat, 2005; Munoz, Rosso, Robles-Frias, et al., 2010).

Es bien conocida la expresión de la SP y RNK1 en procesos proliferativos, dada su capacidad mitogénica, comprobada inicialmente en diferentes tipos celulares sanos como células del tejido conectivo, sinoviocitos, fibroblastos y linfocitos (Lotz et al., 1987; Nilsson et al., 1985; Payan et al., 1983; Ziche, Morbidelli, Pacini, Dolara, et al., 1990). Igualmente se ha comprobado la capacidad de la SP y el RNK1 para estimular la neoangiogénesis a través de la inducción de proliferación endotelial, por una acción directa de la SP sobre los RNK1 a nivel microvascular, siendo fundamental este proceso para el desarrollo tumoral y no tumoral (Ziche, Morbidelli, Pacini, Geppetti, et al., 1990). La SP a través del RNK1, puede influenciar la estructura vascular y la función de las células endoteliales dentro y alrededor de los tumores, aumentando el flujo sanguíneo y consecuentemente, influyendo en la proliferación celular, supervivencia de las células y en la migración celular (Hennig, Laissue, Horisberger, & Reubi, 1995).

La migración celular, es un prerequisite para la invasión y metástasis, y es dependiente de moléculas de señalización de los sistemas inmunes y neuroendocrinos (Rosso et al., 2012). El RNK1 es un importante regulador de la motilidad de una gran variedad de células (Dunzendorfer, Meierhofer, & Wiedermann, 1998; Koyama et al., 1998; Lang, Drell, Niggemann, Zanker, & Entschladen, 2003; Rittner et al., 2007; Ruff, Wahl, & Pert, 1985; Schratzberger et al., 1997), e induce cambios en la membrana celular no asociados a apoptosis denominados "*blebbings*", en células embrionarias renales

HEK293 dependientes de la activación de Rho/Rock, que son necesarios para la diseminación e invasión de las células tumorales (Meshki et al., 2009).

Además de las acciones mitogénica, neoangiogénica y estimuladora de la migración celular, la SP tras su unión al RNK1, ejerce un efecto antiapoptótico a nivel de las células tumorales. Se ha publicado que tras la unión de la SP a RNK1 aumenta mediante la vía fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K), la fosforilación de Akt o proteincinasa B (PKB) que es una serina-treonina cinasa que media un efecto antiapoptótico a través de la proteína bcl-2 (Cheng et al., 1997).

La existencia de RNK1 ha sido demostrada en múltiples líneas celulares tumorales. En la década de los 80 se identificó la presencia de SP y otros neuropéptidos en tumores primarios del SNC de humanos (Allen et al., 1985). Hennig, posteriormente demostró la existencia de RNK1 en células tumorales de astrocitoma, glioblastoma, carcinoma medular de tiroides, cáncer de mama y ganglioneuroblastoma, observando además que en la mayoría de estos tumores este receptor se expresaba en los vasos sanguíneos intra y peritumorales. Con este hallazgo planteó la hipótesis de que la SP participa en la progresión y crecimiento tumoral a través de su relación con los vasos sanguíneos de la vecindad, actuando de forma autocrina y paracrina en este contexto tumoral (Hennig et al., 1995).

En 1996, Luo y colaboradores comprobaron *in vitro* por primera vez que concentraciones fisiológicas de SP inducen mitogénesis a través del RNK1 en una línea celular de astrocitoma humano (Luo, Sharif, & Sharif, 1996). Pocos años después se demostró en un modelo animal de ratones atímicos a los que se les inyectaban células tumorales de astrocitoma humano, que el complejo SP-RNK1 participa en el desarrollo y crecimiento *in vivo* del tumor (Palma et al., 2000).

En la última década, numerosos trabajos, entre los que destacan los realizados por el grupo del Dr. Miguel Muñoz, han puesto de manifiesto que tanto la SP como su receptor el RNK1 se expresan en diferentes tipos de células tumorales. En todos los tipos de tumorales estudiados, la SP de una forma concentración-dependiente (nM), induce proliferación celular y mitogénesis, habiéndose demostrado el efecto antitumoral derivado del bloqueo de RNK1 con diferentes antagonistas específicos de éste receptor. Destacan los estudios llevados a cabo en retinoblastoma (Munoz et al., 2007; Munoz, Rosso, Perez, Covenas, Rosso, Zamarriego, Sault, et al., 2005), neuroblastoma y glioma

(Munoz, Perez, Covenas, et al., 2004; Munoz, Rosso, Perez, Covenas, Rosso, Zamarriego, & Piruat, 2005), leucemia aguda linfoblástica (Munoz, Gonzalez-Ortega, & Covenas, 2012), melanoma (Munoz, Perez, Rosso, et al., 2004; Munoz, Rosso, Robles-Frias, et al., 2010), adenocarcinoma gástrico y de colon (Rosso et al., 2008), cáncer de mama (Bigioni et al., 2005; D. Singh et al., 2000), carcinoma laríngeo (Esteban et al., 2009; Munoz et al., 2008), cáncer de pulmón (Munoz, Gonzalez-Ortega, Rosso, et al., 2012), osteosarcoma (Munoz, Berger, et al., 2014), y hepatoblastoma (Berger et al., 2014). También se ha estudiado el papel de la SP y su receptor en el tejido tumoral de cáncer de páncreas (Friess et al., 2003), tumor queratoquístico odontogénico (Gonzalez Moles et al., 2008), carcinoma esofágico (Dong et al., 2015) y en el carcinoma oral de células escamosas (Brener et al., 2009).

Ha sido también demostrado, que las células tumorales sobreexpresan RNK1 en comparación con células no tumorales como ocurre en las líneas tumorales pancreáticas en comparación con controles normales (de 25-36 veces más receptores en células tumorales), y que el número cuantificado de receptores es significativamente mayor en pacientes con estadios avanzados de enfermedad (Friess et al., 2003; Munoz, Rosso, & Covenas, 2010; D. Singh et al., 2000). También se han correlacionado el número de receptores de otras líneas celulares como el glioblastoma y el astrocitoma, con los fenotipos de mayor malignidad de los tumores (Hennig et al., 1995; Kast, 2009). Finalmente la expresión de ARNm que codifica el RNK1, está aumentado en tejidos tumorales pero no en tejidos no tumorales (D. Singh et al., 2000).

La SP ha sido localizada tanto en el citoplasma como en el núcleo de las células tumorales y en lesiones no tumorales que pueden sufrir malignización (Brener et al., 2009; Esteban et al., 2009; Gonzalez Moles et al., 2009; Gonzalez Moles et al., 2008; Munoz, Gonzalez-Ortega, Rosso, et al., 2012; Munoz, Gonzalez-Ortega, et al., 2014), así como el RNK1 también ha sido localizado en el núcleo celular con menor expresión, también en células no tumorales placentarias (Munoz et al., 2013; Munoz, Pavon, et al., 2010). La localización de un péptido, indica a priori que puede estar involucrado en las funciones de la estructura que contiene el péptido implicado. Así, la presencia de SP en el núcleo de las células tumorales significa que el péptido puede regular la actividad nuclear de éstas, como modulador genético, mediante la unión a RNK1. Por tanto, la SP puede actuar como un factor epigenético (Munoz, Covenas, Esteban, & Redondo, 2015; Munoz, Pavon, et al.,

2010), es decir, induciendo una regulación genética que no implica cambio en la secuencias de ADN, a través de la regulación de diversos factores de transcripción implicados en el cáncer como las cinasas ERK1/2, c-myc, c-fos, c-jun, AP-1, NF- κ B y el factor inducible por hipoxia (HIF-1 α) (Koh, Tamizhselvi, & Bhatia, 2010; Luo et al., 1996; Walczak-Drzewiecka, Ratajewski, Wagner, & Dastych, 2008).

La regulación de la proliferación celular trofoblástica implica un balance delicado entre la expresión de protooncogenes y los genes supresores de tumores, siendo algunos conocidos en la fisiopatología de la mola hidatidiforme. Han sido publicados distintos trabajos sobre la biología molecular de la proliferación de la mola hidatidiforme y del coriocarcinoma, describiéndose la expresión de diversos genes supresores de tumores y oncogenes (Fulop, Mok, & Berkowitz, 2004), que pasamos a relacionar.

Entre los genes supresores de tumores descritos se encuentran: TP53, p21, RB y DOC-2/hDab2.

TP53 es un gen que codifica un factor de transcripción (p53), que es una proteína supresora de tumores y proapoptótica, y que se expresa en el citotrofoblasto de la mola parcial, pero fundamentalmente de la mola completa y coriocarcinoma, como sucede en los tejidos con alta capacidad proliferativa (H. W. Li, Tsao, & Cheung, 2002). Mutaciones en este gen podrían inducir proliferación anormal. (Fulop et al., 2004; Fulop, Mok, Genest, Gati, et al., 1998). En distintos tumores se ha encontrado expresión aumentada de formas salvajes de p53 que inducen proliferación celular (Cheung et al., 1994; Fulop, Mok, Gati, & Berkowitz, 2002). Ha sido propuesto un mecanismo de regulación negativa de la expresión de p53 a través de la SP-NK1, en las células hematopoyéticas progenitoras, por lo que podría ejercer también control sobre este gen supresor de tumores, favoreciendo la proliferación celular (Vishalakumar, Patel, Moharita, Harrison, & Rameshwar, 2006). La expresión de SP-RNK1 que hemos encontrado, podría regular la proliferación celular de la mola hidatidiforme, disminuyendo la expresión de este gen.

p21 es un gen supresor de tumores que codifica una proteína inhibidora de una quinasa dependiente de ciclina, y este gen es regulado por la proteína p53. Es también un modulador de la apoptosis favoreciéndola en los tejidos más diferenciados y menos jóvenes. Pero en determinadas circunstancias, p21 puede inhibir la apoptosis actuando a diferentes niveles de la cascada apoptótica, estimulando además la proliferación habiéndose descrito por tanto, una actividad oncogénica de esta proteína (Abbas & Dutta,

2009; Roninson, 2002). Este gen se expresa en el sincitiotrofoblasto y en trofoblasto extravellositario, de la mola parcial pero más intensamente a nivel de la mola completa y del coriocarcinoma (Fulop et al., 2004; Fulop, Mok, Genest, Gati, et al., 1998). La sobreexpresión de p21 en tejidos de ETG ha sido descrita, de manera que esta expresión parece independiente de la p53, estando asociada esta expresión con los tejidos más diferenciados y con mayor senectud (H. W. Li et al., 2002). Aunque la p21 ejercería un papel inhibidor del ciclo celular, sin embargo se ha comprobado la sobreexpresión de este gen en neoplasias como el cáncer gástrico, cerebral, de próstata, ovario, de mama y carcinoma esofágico de células escamosas, ejerciendo entonces una acción oncogénica favoreciendo la transcripción de factores con acción mitogénica y antiapoptótica (Abbas & Dutta, 2009; Roninson, 2002).

En esta expresión de p21, están implicados diversos factores de crecimiento, como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor transformante del crecimiento α (TGF- α), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) o el factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF) (T. Shimizu et al., 1996). Estos factores de crecimiento están a alta concentración en el sincitiotrofoblasto. La SP y RNK1 podrían contribuir de forma indirecta a la sobreexpresión de p21 por un lado, a través de la transactivación de los EGFR, mediante la proteólisis de los ligandos de estos receptores. Por otro lado, se ha descrito que la liberación de GM-CSF, está regulada por SP (Katsanos et al., 2008) y que la liberación de TGF- α en las células epiteliales está mediada por SP (Hoffmann, Hoeck, Deters, Werner-Martini, & Schmidt, 2010). También en cultivo de fibroblastos, se comprobó el aumento de expresión de ARNm de EGF y FGF inducido por la SP (X. N. Lai, Wang, Wei, Zhu, & Wang, 2003). Por tanto en el caso de la mola, la SP podría estimular la producción de la p21 a través de los factores de crecimiento que regula. De este modo podría ejercer una regulación de la apoptosis favoreciéndola en las células con diferenciación terminal o favoreciendo el efecto antiapoptótico de p21 como en otros procesos tumorales referidos antes.

La proteína RB es una proteína supresora de tumores cuyas mutaciones implican una proliferación anormal. La inmunohistoquímica en citotrofoblasto y trofoblasto extravellositario es positiva en la mola completa y coriocarcinoma aunque también la mola parcial en menor medida (Fulop et al., 2004; Fulop, Mok, Genest, Gati, et al., 1998).

Sería interesante estudiar la posible relación existente entre RB y la SP y el RNK1, dado que no encontramos en la actualidad datos publicados al respecto.

El gen DOC-2/hDab2, es un gen supresor del ciclo celular. Mientras que se ha demostrado una alta expresión en células trofoblásticas normales, hay un descenso muy importante de la expresión de este gen en las molas parciales y mucho menor en las completas y coriocarcinomas, lo que sugiere que la regulación disminuida de este gen puede relacionarse con el potencial maligno de las células trofoblásticas y estar implicado en la patogenia de la ETG. La alteración de este gen, puede disregular la unión del complejo SOS-Grb2, contribuyendo a la activación de Ras, y a la transformación maligna de las células normales del trofoblasto (Fulop, Colitti, et al., 1998; Fulop et al., 2004).

Esta vía de señalización de las MAPKS es iniciada, entre otros factores de crecimiento, por la activación del EGFR, que puede ser transactivado por la unión de SP a RNK1, como sucede en otros tejidos tumorales. Tras la unión del ligando, se produce una activación de su tirosina quinasa, y una transfosforilación de los residuos de tirosina de su extremo C-terminal, que fosforilados son reconocidos por las proteínas con dominios SH2 como la proteína adaptadora Grb2 con la que interacciona SOS1 que es un factor intercambiador de nucleótidos de guanina. Tras la formación del complejo Grb2/Sos, éste se transloca a la membrana plasmática estimulando el intercambio de nucleótidos en Ras, transformándose de su forma pasiva Ras-GDP en su forma activa Ras-GTP. El Ras activo es capaz de activar las serina/treoninas quinasas Raf-1, A-RAf y B-RAf, que fosforilan a las tirosina/treonina quinasas duales (MEK1/2) que finalmente fosforilan a las serina/treonina quinasas ERK1/2 (Rosso et al., 2012). Una vez que son activadas, pueden fosforilar a nivel nuclear factores de transcripción, entre otros c-myc, c-Jun, c-Fos, Elk-1 y p62TC. Por lo tanto, la activación de EGFR a través de la SP en situaciones en las que haya una disregulación del gen DOC-2/hDab2 como en la mola hidatidiforme, puede contribuir a la proliferación anormal de las células del trofoblasto, por la activación de los factores de transcripción a través de la SP como referíamos anteriormente, como consecuencia de la transactivación del EGFR y activación de la vía de MAPKS (Davis, 1993; Plotnikov, Zehorai, Procaccia, & Seger, 2011).

La proteína activadora 1 (AP-1) es un factor de transcripción dimérico compuesto por subunidades de proteínas pertenecientes a las familias de fos (v-Fos, c-Fos, FosB, Fra1, Fra2), jun (v-Jun, c-Jun, JunB, JunD), factor de transcripción activado o ATF (v-Jun, c-Jun,

JunB, JunD) y JDP o proteína de dimerización de jun (JDP1, JDP2). La síntesis de este factor de transcripción implicado en la proliferación, diferenciación y apoptosis, está regulado por la transcripción de sus genes, que es activada por la vía de las MAPKS en respuesta a factores de crecimiento, oncoproteínas, citoquinas o radiaciones (Briese, Sudahl, Schulte, Loning, & Bamberger, 2005). En las molas hidatidiformes, c-jun se expresa en el núcleo del citotrofoblasto vellositario. Las proliferaciones trofoblásticas de la superficie vellositaria de las molas hidatidiformes, que son una mezcla de cito, sincitio y trofoblasto intermedio, son fuertemente positivas para c-jun, junD, fra2 y c-fos. El trofoblasto a nivel del lugar de implantación de la mola también expresa c-Jun, JunD y Fra2. En los coriocarcinomas hay positividad para c-Jun y Fra2, mientras que JunB y Fra1 tienen escasa expresión. No hay expresión de JunB en la proliferación trofoblástica ni de la mola ni en los coriocarcinomas, mientras que existe una fuerte positividad en la placenta normal. Los estudios in vitro han mostrado que existe una función antagonista de c-Jun y Jun B en el control del crecimiento. De este modo, mientras que c-Jun reprime el tumor supresor p16 y activa la proliferación, JunB activa los genes supresores de tumores e inhibe el proceso de proliferación. Del equilibrio de la expresión de estas proteínas se producirá un desarrollo placentario normal o anormal. Por tanto, c-Jun y JunD se han propuesto como marcadores posibles de tumorigénesis mientras que JunB supone un marcador de inhibición para procesos proliferativos, permitiendo diferenciar entre tejido trofoblástico normal y trofoblasto proliferativo dentro de una ETG (Briese et al., 2005). Como hemos referido antes, la SP a través del RNK1, podría estar implicada en la expresión de AP-1 a través de la regulación de factores de transcripción que constituyen sus subunidades como fos y jun (Munoz et al., 2015), lo que implicaría que la SP estaría regulando la proliferación, diferenciación y un efecto antiapoptótico en la célula trofoblástica ejerciendo su función como neuromodulador genético. Por tanto, si se bloquean los RNK1, se bloquean las funciones fisiopatológicas de la SP y se obtendría inhibición de la proliferación, diferenciación y estimulación de la apoptosis.

Se ha descrito en la literatura la expresión aumentada en el coriocarcinoma de HIF-1 α , por lo que la SP podría intervenir en su fisiopatología, dado que induce su expresión, contribuyendo así a la proliferación de esta patología tumoral (Bolat et al., 2010).

No hemos encontrado en la literatura publicadas las implicaciones en la fisiopatología de la mola hidatidiforme humana del factor de transcripción NF- κ B. Basándonos en

nuestros hallazgos de expresión de la SP y de RNK1 en las células de la mola hidatidiforme, y en que la SP al unirse al RNK1 activa el factor de transcripción NF- κ B que regula la expresión de IL-1, IL-6, IL-8 y TNF- α (Hoesel & Schmid, 2013) y procesos de proliferación y oncogénesis en múltiples líneas tumorales (Huber et al., 2004; Karin, 2006, 2009) junto con efectos antiapoptóticos (Kucharczak, Simmons, Fan, & Gelinas, 2003), sería interesante estudiar la expresión de NF- κ B en las células de la mola para una mejor comprensión de este fenómeno fisiopatológico.

Entre los oncogenes implicados en la fisiopatología de la mola se han descrito: MDM2, la familia de oncogenes relacionados con EGFR, bcl-2, c-myc, c-fms, c-sis, c-fos.

El oncogen MDM2, codifica la proteína MDM2 que es un regulador negativo del gen supresor TP53, y tiene expresión aumentada en las molas parciales, completas y coriocarcinoma (Fulop, Mok, Genest, Gati, et al., 1998). La sobreexpresión de MDM2, puede inhibir la acción de los productos de TP53 y RB, que son fundamentalmente inhibidores de la proliferación y dar lugar a la transformación neoplásica o a un comportamiento más agresivo de la ETG (Fulop et al., 2004; Fulop et al., 2002). Se ha sugerido una posible inducción de la expresión de MDM2, a través de la vía de señalización de las MAPK que, como es conocido, podría ser iniciada por el complejo SP-RNK1 (Gilkes et al., 2008; Ries et al., 2000; Urso, Calabrese, Favaretto, Conte, & Pasello, 2015).

La familia de los genes relacionados con el EGFR (EGFR, c-erbB-2, c-erbB-3, c-erbB-4), parece tener un papel muy importante en la patogénesis de la ETG. Estos receptores, además de ejercer su función a través de su unión a los ligandos en la membrana citoplasmática iniciando las vías de señalización, también pueden traslocarse hasta el núcleo, activando factores de transcripción (Fock et al., 2015).

La interacción entre EGFR y los receptores acoplados a proteína G, tiene una papel fundamental para desencadenar la activación de moléculas de señal implicadas en la proliferación en el cáncer, angiogénesis y metástasis (Lappano & Maggiolini, 2011). Para ello, es preciso que se produzca la transactivación de estos receptores a través de receptores acoplados a proteína G, entre los que se encuentra el RNK1. Es sabido que la SP a través de su unión a RNK1 activa los miembros de ADAMS, que son una familia de proteasas dependientes de zinc (disintegrina y metaloproteínasa), y que a través de proteólisis procesan los siete ligandos de estos receptores que son proteínas

transmembrana (Cottrell et al., 2006; Steinhoff et al., 2014), transactivando al EGFR e induciendo la activación de las MAPKs (ERK1/2) que están implicadas en la regulación del crecimiento celular y la diferenciación. También activan la vía de la PIK3/Akt que actúa sobre la supervivencia celular con un efecto antiapoptótico (Citri & Yarden, 2006). De este modo convergen la activación de RNK1 y de EGFR, aumentando las vías por las que la SP puede controlar los mecanismos intracelulares de la mitogénesis (Castagliuolo, Valenick, Liu, & Pothoulakis, 2000).

La activación celular a través de los EGFR puede producirse mediante un mecanismo autocrino, o una vez que se ha producido la liberación proteolítica del ligando soluble, mediante un mecanismo paracrino o endocrino (Schneider & Wolf, 2008).

Algunos autores describen a nivel de la mola hidatidiforme humana y del coriocarcinoma, que todas las poblaciones placentarias expresan EGFR, con una expresión más intensa en estas dos entidades que en la mola parcial o en la placenta normal (Fulop et al., 2004; Fulop et al., 2002; Tuncer et al., 2000). Fock describe que el EGFR está más expresado en el sincitiotrofoblasto, en el trofoblasto vellositario fundamentalmente y en el trofoblasto extravellositario proximal de las columnas trofoblásticas, si comparamos con controles de placenta normal, lo que explicaría la hiperplasia trofoblástica en la mola (Fock et al., 2015).

Además de haberse evidenciado la sobreexpresión de EGFR en las molas hidatidiformes como hemos referido, también se ha publicado la existencia en las molas de mutaciones en el dominio externo de EGFR (por amplificación de genes) que inducen una fosforilación constitutiva del receptor secundaria a la dimerización del receptor en ausencia de ligando exógeno, perpetuando la señalización (Jacob & Balaram, 2012). Estas mutaciones se correlacionan con un comportamiento más agresivo de la mola hidatidiforme, pero no constituyen los únicos mecanismos de aumento de señalización, existiendo también sobreexpresión de receptores, aumento del reciclaje y podríamos proponer, aumento de expresión de SP Y RNK1 que aumentara la activación de este receptor.

Hussein describe la localización inmunohistoquímica de EGFR en la mola hidatidiforme humana y en la mola invasiva en el citotrofoblasto y en el sincitiotrofoblasto, junto con una coexpresión de EGFR y bcl-2 y una correlación directa entre la expresión de ambos,

probablemente secundaria a la activación de Akt, influyendo ambos oncogenes en la proliferación y supervivencia de la mola hidatidiforme (Hussein, 2009).

El oncogen c-erbB-2 tiene mayor expresión a nivel del trofoblasto extravellositario y fundamentalmente en las molas completas y en el coriocarcinoma. La sobreexpresión de este oncogen puede estar asociado con una historia natural agresiva de ambas patologías (Fock et al., 2015; Fulop et al., 2004; Fulop, Mok, Genest, Gati, et al., 1998; Tuncer et al., 2000).

Algunos autores han propuesto que la expresión inmunohistoquímica intensa de c-erbB-3 y EGFR en el trofoblasto extravellositario en la mola completa, se ha correlacionado significativamente con el desarrollo de neoplasia gestacional trofoblástica (Fulop et al., 2004; Tuncer et al., 2000). Los hallazgos de Fock indican que existe expresión conjunta de los receptores ERBB2 y ERBB3 (las proteínas expresadas de los oncogenes c-erbB-2 y c-erbB-3) a nivel del trofoblasto intermedio extravellositario (intersticial y endovascular), constituyendo un heterodímero que se correlaciona con mal pronóstico del proceso proliferativo (He et al., 2012).

ERBB4 (proteína de la expresión del oncogen c-erbB-4), se expresa en su forma nuclear, que se obtiene por proteólisis del receptor de membrana, activando los factores de transcripción, a nivel del trofoblasto extravellositario. ERBB4 en su forma de receptor transmembrana, se expresa en el trofoblasto vellositario. Fock describió que son EGFR y ERBB4 los únicos que se expresan en el trofoblasto proliferativo, pues son los únicos que pueden responder a los ligandos específicos activando las vías de señalización mitogénicas y antiapoptóticas e induciendo la proliferación de la mola, mientras que ERBB2 y ERBB3 estarían implicados en la malignización (Fock et al., 2015), lo que se ha demostrado en otros tumores (Holbro et al., 2003).

Por todo ello en base a la expresión de SP y RNK1 que hemos encontrado en la mola hidatidiforme, la activación de EGFR a través de sus ligandos se llevaría a cabo mediante la unión de la SP a RNK1, ejerciendo por tanto el complejo SP-RNK1 un efecto mitogénico y antiapoptótico a través de la vía de señalización de los EGFR.

El oncogen c-myc, que da lugar al factor de transcripción c-myc, está fuertemente expresado en la mola completa y en el coriocarcinoma, desempeñando una función importante en el control de la proliferación y la diferenciación, por ello existe síntesis de ARNm a nivel del citotrofoblasto e inmunorreactividad de c-myc en sincitiotrofoblasto. La

sobreexpresión de c-myc inhibe la diferenciación y favorece la proliferación del tejido, y la expresión de c-myc puede ser inducida por factores de crecimiento y por sus receptores, que requieren la activación de proteínas G que puede estar mediada por la SP-RNK1, como hemos referido con anterioridad (Fulop, Mok, Genest, Szigetvari, et al., 1998). La expresión de c-myc puede inducir apoptosis bajo condiciones restrictivas para el crecimiento (Fulop et al., 2002; H. W. Li et al., 2002). La SP a través de su unión al RNK1 activando la vía de señalización de las MAPKs, produce mitogénesis. Se sabe que la estimulación con la SP, induce aumento en la producción de c-myc (Luo et al., 1996), por lo que el complejo SP-RNK1, podría regular también la proliferación de la mola hidatidiforme a través de este oncogen.

También ha sido descrita la sobreexpresión de la oncoproteína bcl-2 en la mola hidatidiforme. El oncogen bcl-2, es un antagonista de la apoptosis y tiene gran importancia en la diferenciación celular. Se expresa en el sincitiotrofoblasto con diferenciación terminal de molas completas y coriocarcinomas. La sobrerregulación de bcl-2 puede tener un papel muy importante en la patogénesis de la mola completa y el coriocarcinoma (Fulop et al., 2004; Hussein, 2009). Se ha relacionado el índice apoptótico del trofoblasto con su capacidad de regresión, de modo que las molas hidatidiformes que regresan, presentan un índice apoptótico alto, mientras que las molas invasivas presentan un índice apoptótico bajo, y la capacidad de apoptosis se relaciona de forma inversamente proporcional con la expresión de bcl-2 (Wong, Ngan, Chan, & Cheung, 1999). Ha sido publicado cómo la SP induce la producción de bcl-2 en macrófagos (B. N. Kang et al., 2001). De este modo la SP a través de bcl-2 podría regular la inhibición de la apoptosis, aunque sabemos que en células muy diferenciadas, como ocurriría en el sincitiotrofoblasto, la SP podría inducir muerte celular programada. Es posible que el índice apoptótico fuera consecuencia de un equilibrio de un doble sistema de regulación: la expresión de bcl-2 inducida por SP y el efecto apoptótico de SP en las células muy diferenciadas sin capacidad replicativa (Castro-Obregon et al., 2002), de modo que este equilibrio se desplazaría hacia la apoptosis en las molas con tendencia a la resolución y hacia el efecto antiapoptótico en las molas con capacidad invasiva.

Otros autores refieren una expresión variable de bcl-2, en función de las características de invasividad de la población celular, con una fuerte expresión en aquellas molas con capacidad metastásica (Candelier et al., 2013).

Se conoce que la SP a través del RNK1, bien mediante la activación de PLC o a través de la activación de EGFR aumenta la producción de IP3, activando la Akt o PKB que confiere señales de supervivencia celular a través de la fosforilación de miembros proapoptóticos de la familia bcl-2 (Flusberg, Numaguchi, & Ingber, 2001) o alterando la expresión de bcl-2 (Pugazhenthii et al., 2000).

El oncogen c-fms que codifica el receptor para el factor estimulante de colonias de macrófagos (CSF o M-CSF), también se expresa en las células del sincitiotrofoblasto de la placenta normal, de la mola parcial, de la mola completa y del coriocarcinoma. Este oncogen también está implicado en la proliferación, supervivencia y diferenciación. Las células del trofoblasto invaden los tejidos adyacentes, controlando el proceso mediante la unión de CSF a los receptores trofoblásticos. CSF-1 puede promover la proliferación celular y el desarrollo de los tumores trofoblásticos gestacionales al interactuar con el receptor de CSF-1 (H. W. Li et al., 2002), pero cuando de forma sinérgica existe sobreexpresión de c-myc, c-erbB-2, bcl-2 y c-fms (Fulop et al., 2002). Existen publicaciones sobre la coestimulación que ejerce la SP junto con CSF-1 en la proliferación de los progenitores mononucleares y fagocíticos (Moore, Osmand, Dunn, Joshi, & Rouse, 1988). Esto iría a favor de la necesidad de coexpresión de varios oncogenes para que la proteína codificada por c-fms pudiera contribuir a la proliferación celular, sabiendo que la SP podría estimular la expresión de c-myc, y de bcl-2 de forma concomitante.

El oncogen c-sis, codifica el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), que también puede activar los oncogenes c-myc y c-fos implicados en la replicación celular del trofoblasto (Fulop et al., 2002). La SP y el PDGF presentan un efecto sinérgico en la proliferación de los fibroblastos de modo que la SP parece inducir la expresión de receptores para PDGF, favoreciendo así la proliferación celular (Rameshwar, Poddar, Zhu, & Gascon, 1997).

Como hemos referido con anterioridad, la mola hidatidiforme humana, es una proliferación del tejido placentario como consecuencia de una alteración en la fecundación, caracterizada por ausencia de genoma materno en el caso de los casos de mola completa, o por exceso del genoma paterno en el caso de la mola parcial. La falta de genoma materno confiere a la mola ausencia de desarrollo de los tejidos embrionarios, y la pérdida o duplicación de regiones cromosómicas, se asocia con condiciones patológicas como ocurre con la enfermedad que nos ocupa. La expresión del receptor de PDGF en

humanos junto con la expresión aumentada de PDGF-B, se correlaciona con la ratio del genoma paterno/materno. Se ha descrito mediante análisis de hibridación *in situ*, que el gen paterno del receptor del PDGF-B está hasta 100 veces más expresado en el citotrofoblasto extravellositario de la mola completa, aumentando el riesgo de transformación de ésta en coriocarcinoma. La activación de la expresión de PDGF-B y del receptor del PDGF en la mola y en los coriocarcinomas, sugieren un importante papel en la tumorigénesis del citotrofoblasto humano (Holmgren, Flam, Larsson, & Ohlsson, 1993). El PDGF presenta una acción mitogénica y de estimulación de la migración celular de manera autocrina y para llevar a cabo estas acciones, es fundamental la fosforilación de los residuos de tirosina del receptor del PDGF, dado que es un receptor tirosín quinasa. La fosforilación de los residuos del receptor es reconocida por moléculas efectoras consideradas como sustratos de estos receptores como la PLC, o como Raf-1, ambos activados por las diferentes vías iniciadas por la unión de la SP al RNK1, de modo que estos receptores se activarían desde el interior de la célula (Heldin & Westermark, 1990).

Podemos inferir por tanto, que muchos son los oncogenes, factores de transcripción y genes supresores de tumores que parecen estar implicados en la fisiopatología de la mola hidatidiforme humana. La SP a través del RNK1, fundamentalmente a través de la transactivación de EGFR y la activación de la vía de las MAPK y de ERK1/2, parece realizar un control importante sobre algunos de los factores de transcripción descritos en la patogenia de la mola hidatidiforme, además de regular la apoptosis por su acción a través de la activación de Akt, por la vía de la transactivación de EGFR o a través de la vía de la PLC. De este modo, la SP podría desempeñar un papel importante en el desarrollo de la proliferación de esta entidad.

Tras todos estos hallazgos referidos, concluimos que la SP a través del RNK1 por tanto, estimula la mitogénesis, la migración neuronal y ejerce un efecto antiapoptótico activando los receptores en las células que proliferan de manera anormal por cuatro mecanismos (Rosso et al., 2012):

- A través de un mecanismo autocrino, por el que la SP es secretada en los tejidos proliferantes.
- A través de un mecanismo paracrino, por el que la SP es secretada desde las células que proliferan actuando a nivel endotelial o en las células circundantes del microambiente.

- A través del sistema nervioso periférico donde la SP es secretada desde las terminaciones nerviosas en aquellos que están tejidos inervados, y que en el caso de la mola, no tendría lugar, dado que es un órgano no inervado.

- A través de mecanismos endocrinos, donde la SP alcanza los tejidos a través de la circulación sanguínea.

Con todas estas evidencias previas sobre el el papel crítico que desempeña el complejo SP-RNK1 sobre el desarrollo tumoral, al considerar que la mola hidatidiforme humana es un proceso proliferativo anormal que incluso puede tener un comportamiento invasivo y metastásico, entendemos que la expresión que hemos encontrado de la SP y RNK1 en las células de la mola, es muy importante en la fisiopatología de esta enfermedad tal y como está descrito en otras líneas celulares tumorales y pretumorales. Esto es debido tanto a la acción mitogénica y antiapoptótica que induce la activación del complejo SP-RNK1, como a la estimulación de la migración celular implicada en las metástasis tumorales.

Esta expresión de SP y RNK1 que hemos descrito a nivel de las células de la mola hidatidiforme humana tiene una implicación terapéutica fundamental, por lo que el desarrollo de una investigación traslacional sobre el uso de antagonistas de RNK1 en esta enfermedad podría suponer un avance importante en el tratamiento de las pacientes.

A lo largo de los últimos años, ha sido ampliamente demostrado que los antagonistas de RNK1 bloquean las acciones fisiopatológicas de un modo concentración-dependiente tras unirse al RNK1, a concentraciones μM . El efecto terapéutico de los antagonistas de RNK1, viene dado por el bloqueo de todas las funciones fisiopatológicas de la SP. De este modo, a nivel de las células tumorales inhiben la migración de las células evitando la invasión y metástasis, inhiben la proliferación celular e inducen la muerte celular por apoptosis (Munoz et al., 2015). Ha sido publicada la eficacia de la acción antitumoral frente a diversas líneas tumorales de distintos antagonistas no peptídicos como L-733,060, L-732,138 y aprepitant (Berger et al., 2014; Bigioni et al., 2005; Guha et al., 2005; Langdon et al., 1992; Mukerji, Ramkissoon, Reddy, & Rameshwar, 2005; Munoz et al., 2008; Munoz, Rosso, & Covenas, 2010, 2011; Munoz et al., 2007; Munoz, Rosso, Perez, Covenas, Rosso, Zamarriego, & Piruat, 2005; Munoz, Rosso, Robles-Frias, et al., 2010; Palma et al., 2000; Reeve & Bleehen, 1994; Rosso et al., 2008; Seckl et al., 1997; Woll & Rozengurt, 1988).

Además, la acción antiproliferativa de los antagonistas de RNK1, tiene lugar mediante una transducción de señal para la apoptosis, tras la unión del antagonista al RNK1 (El-Salhy & Starefeldt, 2003; Munoz, Rosso, & Covenas, 2010; Munoz et al., 2011; Munoz et al., 2007). Por otro lado la migración celular tumoral implicada en la invasividad y metástasis de las células, puede ser específicamente inhibida por antagonistas de RNK1 (Lang et al., 2004; Munoz et al., 2011), al igual que pueden ser bloqueados mediante los antagonistas de RNK1, los cambios morfológicos de la membrana celular incluyendo el “blebbing” no apoptótico (Meshki et al., 2009), que es importante para la diseminación e invasión celular (Fackler & Grosse, 2008; Munoz et al., 2011). También ha sido publicado que los receptores NK1 están presentes en las líneas celulares de mama MDA-MB-468 y que el antagonista L-733,060 inhibe completamente la actividad migratoria mediada por SP, y en pacientes con riesgo de cáncer de mama, el riesgo de recurrencia o metástasis se reduce 4 veces durante un período de seguimiento, cuando la cirugía se asocia con anestesia paravertebral. La anestesia paravertebral parece bloquear la migración, invasión y metástasis inducida por la SP al atenuar la respuesta al estrés quirúrgico, inhibiendo la liberación de la SP de las fibras nerviosas y evitando la necesidad de opioides, mejorando así la función de las células inmunes (Exadaktylos, Buggy, Moriarty, Mascha, & Sessler, 2006; Munoz, Rosso, Casinello, & Covenas, 2010).

Los antagonistas de RNK1 tienen igualmente un efecto antiangiogénico que además puede regular negativamente el crecimiento de la masa tumoral (Berger et al., 2014; Guha et al., 2005; Munoz et al., 2011).

En general en los ensayos clínicos realizados, los antagonistas de RNK1 son fármacos seguros asociados con mínimos efectos secundarios, que se deben en la mayor parte de los casos a su uso concomitante con la quimioterapia. En la actualidad aprepitant (Emend, MK-869, L-754,030) y su profármaco fosaprepitant (Ivemend, MK-0517, L-758,298), son los únicos antagonistas de RNK1 usados en la práctica clínica con indicación aprobada para el tratamiento de las náuseas y vómitos agudos y retardados inducidos por quimioterapia y para las náuseas y vómitos posoperatorios, siendo efectivo para el tratamiento del dolor y la depresión. Por ser un fármaco introducido ya en la clínica, aprepitant sería un candidato de elección para valorar su uso como fármaco antitumoral a través de ensayos clínicos. Sí ha sido evaluada la seguridad de aprepitant en diversos ensayos clínicos (Munoz & Covenas, 2013b), siendo bien tolerado a dosis de 300 mg/día sin diferencias

estadísticamente significativas en la frecuencia de efectos adversos en comparación con el tratamiento placebo (Kramer et al., 1998). También ha sido publicado que Aprepitant es seguro con respecto a las células fibroblásticas humanas, siendo la IC_{50} para éstas aproximadamente tres veces más alta que para las células tumorales (Munoz & Rosso, 2010), dado que la expresión de los RNK1 es menor que en las células tumorales y no están regulados positivamente a nivel de la membrana. Otros fármacos antagonistas han sido bien tolerados (casopitant, vofopitant, L-759,274, CP-122,721, ezlopitant, rolapitant and serlopitant), pero precisan estudios de seguridad (Munoz & Covenas, 2013b).

Por tanto, la utilización de antagonistas de RNK1 podría ser un tratamiento eficaz y seguro para un proceso proliferativo como es la mola hidatidiforme humana, evitando del mismo modo la invasividad y diseminación de las células de la mola, y por tanto la progresión de la enfermedad hacia la mola persistente o metastásica, e incluso la transformación en neoplasia trofoblástica gestacional posmolar que oscila entre el 15-20% tras la mola hidatidiforme completa y el 0,5-1% tras la mola hidatidiforme parcial (Mangili et al., 2014; Seckl et al., 2013). Podría suponer una aportación fundamental al tratamiento de esta enfermedad la realización de estudios con antagonistas de RNK1 en pacientes con diagnóstico de mola hidatidiforme, dado que es excepcional la gestación molar en animales (Hui, 2011).

Podría al mismo tiempo plantearse como tratamiento coadyuvante de los antagonistas de RNK1, el uso de anestesia paravertebral durante la evacuación mediante legrado por aspiración de la mola hidatidiforme. La anestesia paravertebral podría bloquear la migración inducida por la SP evitando la controvertida administración profiláctica de quimioterapia inmediatamente tras la evacuación de la mola, que está asociada a una reducción de la incidencia de neoplasia trofoblástica gestacional del 15-20% al 3-8% (Berkowitz & Goldstein, 2009a), pero que expondría a más del 80% de las pacientes a una toxicidad innecesaria y no elimina la necesidad de seguimiento de las pacientes, pudiendo inducir resistencia a las drogas (Fu et al., 2012). El uso de quimioterapia profiláctica se limita a situaciones especiales en las que haya un riesgo de neoplasia trofoblástica gestacional alto o no sea posible un seguimiento de los niveles de hCG (Mangili et al., 2014; Ngan et al., 2012). Los factores de alto riesgo de desarrollo de neoplasia trofoblástica gestacional serían la edad materna mayor de 40 años, el tamaño uterino mayor que la

edad gestacional, niveles de hCG preevacuación mayores de 100,000 mIU/ml, quistes tecaluteínicos mayores de 6 cm e historia de gestación molar previa (Berkowitz & Goldstein, 2013).

Es importante el hecho de que diferentes trabajos han evidenciado la presencia en la placenta de distintos NP y TK y sus receptores, entre los que se han encontrado la SP y el receptor RNK1.

La presencia de SP en tejido placentario humano se ha descrito inicialmente mediante radioinmunoensayo en las vellosidades coriales (Sastry et al., 1981), y en la placa basal y membranas fetales en las células deciduales mediante técnicas de inmunohistoquímica, junto con otros neuropéptidos de diversos ejes neuroendocrinos (VIP, PRGC, NPY, somatostatina, galanina entre otros), en la interfaz materno-fetal lo que apoyaba un control neuroendocrino a nivel placentario del flujo sanguíneo, de la proliferación placentaria y el desarrollo del feto (Graf et al., 1996).

Brownbill, demostró una vasodilatación dosis-dependiente mediada por NKB a través del RNK1, evidenciando una expresión de ARNm predominante a nivel placentario y de la vena umbilical y endotelio. Sugería así la regulación paracrina del tono vascular fetal después de su síntesis en el sincitiotrofoblasto. La producción aumentada de NKB en el sincitiotrofoblasto en la preeclampsia, planteaba la acción local vasodilatadora para compensar el flujo sanguíneo reducido a través de la circulación uterina (Brownbill et al., 2003), que otros autores consideraron vasodilatación endotelio independiente con acción directa sobre los receptores del músculo liso de los vasos (Laliberte, DiMarzo, Morrish, & Kaufman, 2004).

Otros autores como Page, investigaron el patrón de expresión de los genes de TK en placentas humanas de gestaciones normales y de gestaciones con preeclampsia. Los niveles de expresión del gen TAC1, que es el gen que codifica la SP, determinados por PCR semicuantitativa, eran muy bajos en placentas normales y en las de gestantes con preeclampsia (Page et al., 2006). El aumento de niveles de TAC1 encontrado de forma puntual en placentas con preeclampsia fue atribuida a la invasión placentaria por células inmunes que son una fuente de expresión del gen TAC1 (T. M. O'Connor et al., 2004). Por otro lado, Page y D'Anna en sus estudios sobre la preeclampsia en animales y humanos, determinaron tanto niveles plasmáticos de NKB en gestaciones normales y en preeclampsia, como expresión de ARNm de TAC3 a nivel placentario (Page et al., 2006).

De sus estudios derivó la implicación en la fisiopatología de esta enfermedad de un incremento de los niveles de esta TK sobre los existentes en gestaciones normales, que a través del RNK3 producirían regulación de la vascularización placentaria mediante la liberación de óxido nítrico en esta situación de placentación anormal (Page et al., 2006; Page et al., 2000; Page, Woods, & Lowry, 2001).

Marzioni evaluó la expresión de ARNm del péptido intestinal vasoactivo (VIP) y de la SP mediante técnicas de hibridación (slot dot) y su localización en placentas humanas del primer y tercer trimestre por inmunohistoquímica. El hallazgo fundamental tanto en las placentas del primer como del tercer trimestre fue una distribución de VIP y SP en sincitiotrofoblasto, con predominio de VIP en el citoplasma y SP en la membrana. En el primer trimestre, el citotrofoblasto vellositario, las células estromales, y el trofoblasto extravellositario o intermedio, también expresaban ambos neuropéptidos. Sin embargo, la tinción en placentas del tercer trimestre para el citotrofoblasto y estroma fue débil para VIP y negativa para la SP, y débil para ambos neuropéptidos en trofoblasto extravellositario y células deciduales (Marzioni et al., 2005).

Ha sido descrita la inmunolocalización de la SP y el RNK1 en la placenta humana, evidenciándose una amplia distribución de ambos tanto en las células del sincitiotrofoblasto y citotrofoblasto vellositario e intermedio, como en la decidua y en las células endoteliales y miocitos de los vasos fetales y umbilicales. Por otro lado se describe la localización intracelular de la SP y del RNK1, destacando fundamentalmente la localización nuclear de la SP sugiriendo un papel de neuromodulación genética (Munoz, Pavon, et al., 2010). Se ha descrito igualmente la inmunolocalización de la SP y el RNK1 en las células de Hofbauer, células que son macrófagos placentarios (Munoz et al., 2013).

Hasta el momento actual, era desconocida la expresión de SP y de su receptor específico RNK1 en la ETG. Nosotros hemos demostrado mediante inmunohistoquímica la expresión de SP y RNK1 en la mola hidatidiforme humana, que es un proceso proliferativo derivado de la placenta, lo que implicaría que el complejo SP-RNK1 participa de la fisiopatología de la mola hidatidiforme, y por tanto la implicación de un NP en el desarrollo de esta enfermedad.

Estos hallazgos que evidencian la presencia a nivel placentario de múltiples NP, entre los que se encuentran la TK y el receptor objeto de nuestro estudio, sugieren la existencia

de mecanismos de control autocrinos, paracrinos y endocrinos en el desarrollo de la placenta, y tras ser evidenciados en la mola hidatidiforme, también de este tejido.

En cuanto a la distribución de la SP, hemos encontrado expresión intensa a nivel nuclear en todos los tipos celulares de la mola hidatidiforme tanto a nivel del trofoblasto vellositario y extravellositario o intermedio, el estroma (fibroblastos y macrófagos), y en la decidua.

La expresión nuclear de la SP en todas las poblaciones celulares de la mola hidatidiforme, sugiere la acción de este NP como modulador genético a nivel del núcleo, regulando las funciones biológicas de estas células, ya sean proliferativas, endocrinas, inmunes o invasivas. Estos hallazgos son muy similares a los encontrados previamente en la placenta que ya sugerían que la SP podría ser un factor epigenético de neuromodulación (Munoz, Pavon, et al., 2010)

El sincitiotrofoblasto que proviene de la fusión de las células citotrofoblásticas, es la unidad endocrina fundamental. La producción hormonal a este nivel es muy intensa: hormonas esteroideas (progesterona y estrógenos), hCG, lactógeno placentario (hPL), hormona adrenocorticotropa (ACTH) y neurohormonas/neuropéptidos (oxitocina, opioides, neuropéptido Y (NPY), hormona liberadora de GH (GHRH) y somatostatina, hormona liberadora de corticotropina (CRF), hormona liberadora de gonadotrofina (GnRH) entre otras), citoquinas y factores de crecimiento (factores transformadores del crecimiento (TGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factores de crecimiento insulina-like (IGFs), proteínas ligadoras de IGF) (Petraglia, Florio, Nappi, & Genazzani, 1996). La expresión de la SP podría traducir el papel de modulador genético de la expresión de todas estas proteínas.

Además de la función endocrina, a través del sincitiotrofoblasto se transportan nutrientes, hormonas, factores de crecimiento y citoquinas y supone una barrera inmunológica.

Las células del citotrofoblasto vellositario, se diferencian a sincitiotrofoblasto. Esta diferenciación constituye proceso fisiológico fundamental para la formación de una población celular caracterizada por sus funciones de síntesis, transporte e inmunitarias. Este proceso está acelerado por algunos factores de crecimiento, como el EGF que se une al EGFR expresado en el citotrofoblasto (Dakour, Li, Chen, & Morrish, 1999; Kurman et al., 2012). Además de EGF, se ha estudiado in vitro, que la formación del sincitio puede estar

inducida por otras moléculas como el factor estimulante de los granulocitos-macrófagos (GM-CSF) (Garcia-Lloret et al., 1994), hormonas como hCG (Yang, Lei, & Rao Ch, 2003), glucocorticoides (Laurent Cronier et al., 1998) y estradiol (L. Cronier, Guibourdenche, Niger, & Malassine, 1999).

Esta diferenciación está acompañada por una pérdida absoluta de la capacidad de proliferación del sincitio. Hemos observado a nivel del sincitiotrofoblasto de los casos estudiados, que presenta hiperplasia por la patología que supone la mola hidatidiforme, una mayor proporción de núcleos atípicos con heterogeneidad de la tinción nuclear con acúmulos nucleares y refuerzo en la membrana nuclear con ausencia de tinción en los brotes sincitiales. Los brotes sincitiales son acúmulos de núcleos en el sincitiotrofoblasto, conectados a la superficie vellositaria por citoplasma y recubiertos de microvilli. Se postula que suponen cambios degenerativos, pudiendo ser la expresión de insuficiencia placentaria, hipoxia, isquemia o mala perfusión de las vellosidades. En nuestro caso, el desarrollo de los brotes sincitiales podría estar en relación con la escasa vascularización de la mola hidatidiforme (Kurman et al., 2012).

Como hemos referido, el sincitiotrofoblasto carece de capacidad proliferativa por su diferenciación terminal manteniendo su capacidad sintética fundamental y presentando características de atipicidad en sus núcleos. Esto podría ser consecuencia del inicio del proceso de la muerte celular programada, que suele describirse en el curso de procesos fisiológicos y fisiopatológicos, entre otras circunstancias, en la eliminación de células maduras o en los procesos de cambio e involución dependientes de hormonas, situaciones que podrían suceder en el sincitiotrofoblasto.

Los mecanismos moleculares por los que se produce la fusión de las células del citotrofoblasto han sido estudiados, mostrando que las etapas de la diferenciación del trofoblasto conducían a una serie de cambios en la membrana plasmática de éste, activando los mismos mecanismo moleculares que en el inicio de la apoptosis (Huppertz, Frank, Kingdom, Reister, & Kaufmann, 1998). En este estudio, el sincitiotrofoblasto mostraba hallazgos heterogéneos, sugiriendo progresión variable en la cascada apoptótica. Inicialmente se describieron una serie de eventos moleculares relacionados con la apoptosis: expresión del receptor Fas (CD95) y su ligando FasL, caspasas, polimerasas implicadas en la reparación de ADN (PARP del inglés, *Poly (ADP-ribose) Polymerases*), topoisomerasa II α implicada en la condensación y separación de los

cromosomas en la mitosis, transglutaminasa II, proteínas ligadoras de ARN que participan en la biogénesis y traducción del ARNm (TIAR del inglés *RNA-binding protein*), factor de necrosis tumoral α (TNF α) y sus receptores p55 y p75 y productos de los genes Bcl-2 y Mcl-1 que pertenecen a la familia de proteínas Bcl-2. Finalmente se describen alteraciones de la ultraestructura con condensación de la cromatina nuclear, deshidratación citoplasmática y “blebs” de membrana. Por último, la consecuencia final de la apoptosis es la agregación nuclear y extrusión de grupos de núcleos apoptóticos juntos con algún citoplasma circundante, formando lo que se conoce como brotes sincitiales que parecen ser el correlato de los cuerpos apoptóticos, y no brotes reales (Benirschke et al., 2012). Como referimos anteriormente, han sido descritos en placentas patológicas como podría suceder en las molas que implican defectos en la placentación o en placentas con preeclampsia, y son más frecuentemente vistos en la gestación precoz pudiendo alcanzar estos brotes la circulación materna llegando hasta el pulmón (Benirschke & Willes, 2010).

Estos hallazgos apoyarían los cambios nucleares observados en nuestro estudio, compatibles con el inicio de la muerte celular programada del sincitio.

Hemos referido con anterioridad que la SP a concentración nM produce proliferación de células normales y tumorales y tiene un efecto antiapoptótico. Al contrario, la SP a concentraciones nM y μ M de manera dependiente de la concentración en las células neuronales, produce muerte celular mediante la unión de la SP al RNK1, dado que este proceso se bloquea al administrar antagonistas de RNK1. Esto probablemente sea debido a que, como es sabido, las células nerviosas maduras, las neuronas que no los neuroblastos, tienen abortado el sistema de duplicación celular. Cuando se activan las señales que inducen mitogénesis, al carecer estas células de la capacidad de mitosis, se produce muerte celular por apoptosis o paraptosis que es una muerte celular programada no apoptótica denominada tipo 2 ó 3 (lisosómica o mitocondrial) (Castro-Obregon et al., 2002). Blanco en su estudio sobre la epilepsia temporal mesial, indica que la neurolisis implicada en la fisiopatología de este trastorno epiléptico está mediada por la SP y el RNK1, apoyando los hallazgos previamente reseñados (Blanco Martínez, 2012).

A favor de la que muerte celular en el sincitiotrofoblasto, que es otro tejido sin capacidad replicativa, sea por apoptosis está el hecho de que hemos observado en los núcleos de las células del sincitiotrofoblasto los cambios propios característicos como

condensación de cromatina y fragmentación nuclear. Por tanto, tras la diferenciación del citotrofoblasto, el inicio de los mecanismos apoptóticos a nivel del sincitio, podrían estar mediados por el complejo SP-RNK1, además de otros tipo de muerte celular programada (Castro-Obregon et al., 2004), dado que esta población celular ha perdido también la capacidad de proliferación.

A nivel del citotrofoblasto, que es la capa proliferativa del trofoblasto vellositario, aunque también presentan una función endocrina importante, observamos tinción de la SP nuclear predominante de la capa basal que es la fundamentalmente proliferativa, dato que podría tener relación con la capacidad replicativa/diferenciadora, de estos estratos basales celulares así como con su mayor actividad metabólica. Se conoce que las células del citotrofoblasto en la placenta son las únicas que presentan síntesis de ADN, y su diferenciación funcional a sincitiotrofoblasto es estimulada por diversas hormonas (hCG, estradiol y glucocorticoides) y péptidos (Kurman et al., 2012). Esta expresión de SP podría estar en relación con la función fundamentalmente proliferativa del citotrofoblasto, estimulando la SP la proliferación de esta población mediante su unión a RNK1 por el reconocido efecto mitogénico tanto en células tumorales como no tumorales (Berger et al., 2014; Bigioni et al., 2005; Brenner et al., 2009; Dong et al., 2015; Esteban et al., 2009; Friess et al., 2003; Gonzalez Moles et al., 2008; Lotz et al., 1987; Munoz, Berger, et al., 2014; Munoz, Gonzalez-Ortega, & Covenas, 2012; Munoz, Gonzalez-Ortega, Rosso, et al., 2012; Munoz, Perez, Covenas, et al., 2004; Munoz, Perez, Rosso, et al., 2004; Munoz et al., 2008; Munoz et al., 2007; Munoz, Rosso, Perez, Covenas, Rosso, Zamarriego, & Piruat, 2005; Munoz, Rosso, Perez, Covenas, Rosso, Zamarriego, Soult, et al., 2005; Munoz, Rosso, Robles-Frias, et al., 2010; Nilsson et al., 1985; Payan et al., 1983; Rosso et al., 2008; D. Singh et al., 2000; Ziche, Morbidelli, Pacini, Dolara, et al., 1990).

El trofoblasto intermedio o extravellositario que es al que se le atribuye la capacidad invasiva del endometrio durante el primer trimestre y que carece de capacidad proliferativa, manifiesta fundamentalmente una expresión de la SP a nivel nuclear. Esta población celular presenta similitudes de invasividad con las células malignas, invadiendo el endometrio a través de la degradación enzimática de la matriz extracelular por diferentes proteasas entre las que tienen una importancia fundamental las metaloproteinasas de la matriz (MMPs 1 y 2), reguladas a su vez por los inhibidores de metaloproteinasas (TIMPs) (Fulop et al., 2004; Huppertz, Kertschanska, Demir, Frank, &

Kaufmann, 1998). La expresión de SP en el trofoblasto se correlacionaría con dos mecanismos inducidos por la SP que podrían favorecer la invasividad de esta población celular. Por un lado la SP, estimula la migración celular a través de la activación de la proteinquinasa asociada a Rho (ROCKs) que regulan la cadena ligera reguladora de la miosina (MLC). La fosforilación de esta proteína se asocia con la formación de pequeñas evaginaciones esféricas surgidas a partir de la membrana conocidas como “*blebs*”, que son fundamentales para la invasión celular, como ha sido descrito en la literatura (Fackler & Grosse, 2008; Gadea, de Toledo, Anguille, & Roux, 2007; Meshki et al., 2009). Por otro lado, también se ha descrito la implicación de la SP en la invasividad celular tumoral mediante la inducción de MMP 1 y 2 (X. Li et al., 2013).

Los macrófagos estromales denominados células de Hofbauer, presentan en nuestro estudio expresión de la SP predominantemente nuclear con debil expresión citoplasmática. Es conocida la expresión de SP y de RNK1 en los macrófagos (Ho et al., 1997), pero la primera descripción en la literatura de la inmunolocalización de la SP y en RNK1 en las células de Hofbauer, fue publicada por el grupo del Dr. Muñoz en el año 2013.

Nuestros hallazgos son concordantes con los descritos previamente en la literatura a nivel de la placenta (Munoz et al., 2013), en los que se evidenciaba un predominio de la expresión nuclear de la SP existiendo también expresión citoplasmática. Esta observación sugiere que la SP está implicada en la regulación nuclear de las múltiples funciones de los macrófagos: regulación del contenido de agua de la vellosidad, transporte de iones y fluidos al intersticio (Demir & Erben, 1984), la absorción de complejos inmunes (Castellucci & Zaccheo, 1989) y la producción de citoquinas, prostaglandinas y tromboxanos (Wetzka, Clark, Charnock-Jones, Zahradnik, & Smith, 1997), productos derivados de los macrófagos y factores de crecimiento (Khan, Katabuchi, Araki, Nishimura, & Okamura, 2000). También funcionan como células presentadoras de antígenos y estimulan el crecimiento y diferenciación del trofoblasto. Ello sucede de modo paracrina a través de la producción de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF o CSF-1), induciendo la proliferación del trofoblasto y la formación del sincitiotrofoblasto. Está descrito que la SP a nivel de los mastocitos induce expresión génica y secreción VEGF (Theoharides et al., 2010), por lo que la expresión de la SP demostrada en las células de Hofbauer, podría estar implicada en la proliferación del trofoblasto a través de la producción aumentada de este factor de

crecimiento, que además se asocia al pronóstico invasivo de los tumores (M. Singh et al., 2012) por una mecanismo independiente de la angiogénesis a través de la activación de vías de señalización que estimulan la mitogénesis (MAPKs) y evitan la apoptosis (Akt) (Goel & Mercurio, 2013) . Por otro lado, existen estudios de coestimulación de la SP con CFS-1 o MCSF en la proliferación de los progenitores mononucleares y fagocíticos (Moore et al., 1988), lo que sugeriría que la expresión nuclear de SP que hemos encontrado podría actuar de forma sinérgica con otros factores de crecimiento, ejerciendo además una acción de neuromodulador genético sobre los macrófagos.

Por otro lado, tras experimentación con cultivos con células citotrofoblásticas en presencia de macrófagos vellositarios, se ha hipotetizado con que los productos específicos derivados de los macrófagos, pueden aumentar de forma significativa y de forma paracrina la secreción de hormonas trofoblásticas (como la hCG), que influye en la diferenciación del citotrofoblasto en sincitiotrofoblasto (Khan et al., 2000), y en el caso de la mola induciendo la hiperplasia del trofoblasto vellositario. El posible que la SP ejerza a través de sus vías de señalización una función proliferativa sobre las células del citotrofoblasto sinérgica con la que ejerce la hCG.

Estas células expresan altos niveles de ARNm de VEGF (Khan et al., 2000), lo que indica el control paracrino de la vasculogénesis y el desarrollo vellositario del trofoblasto en la placenta normal. Hemos encontrado expresión SP macrofágica que podría de forma sinérgica con el VEGF, inducir angiogénesis como es conocido (Ziche, Morbidelli, Pacini, Geppetti, et al., 1990). Sin embargo, las células de Hofbauer están muy disminuidas en las molas precoces, fenómeno que también hemos observado en nuestra muestra, lo que podría estar asociado con la falta de desarrollo de la vascularización vellositaria una vez que aparecen los cordones celulares angiogénicos. En nuestro estudio no ha sido posible valorar la expresión endotelial de la SP y RNK1, precisamente por la falta de desarrollo de la vascularización vellositaria que caracteriza a la mola hidatidiforme.

La SP presenta expresión fundamentalmente nuclear en los fibroblastos del estroma. Aunque no se ha descrito la expresión de la SP de las células estromales placentarias, sí que existe evidencia de la acción de ésta sobre los fibroblastos en otras localizaciones, estimulando su proliferación. Se ha descrito la expresión de SP y RNK1 a nivel de los fibroblastos cutáneos (Liu, Hu, Zhu, Li, & Sun, 2006), y el efecto mitogénico que el complejo SP-RNK1 ejerce sobre la proliferación de estas células ya sea a nivel cutáneo o a

otros niveles (Burssens et al., 2005; Kant et al., 2015; Tian et al., 2014), describiéndose la acción mitogénica de la SP a través de la activación de la vía de la fosfolipasa A₂ y la producción de metabolitos del ácido araquidónico (Kahler, Herold, Reinisch, & Wiedermann, 1996). De este modo podemos plantear que el papel de la SP a nivel del núcleo los fibroblastos estromales en la mola hidatidiforme, es el de regular las funciones de proliferación de estas células.

La expresión de la SP que hemos encontrado en la decidua es principalmente nuclear. Hemos de recordar que la decidua constituye una interfaz anatómica metabólicamente muy activa, permitiendo la comunicación entre las membranas fetales y el miometrio adyacente. La placenta madura está formada por la decidua parietal en contacto con el corion, y la decidua basal que constituye el componente materno de la placenta bajo el polo de implantación. Las capas que constituyen la decidua son la zona compacta, la zona esponjosa (siendo ambas la zona funcional) y la zona basal. Es la zona esponjosa la que presenta una actividad secretora muy abundante y es fundamental para la nutrición histiotrófica de las primeras fases del desarrollo antes del establecimiento de la circulación placentaria, a través de la producción de glucógeno derivada del endometrio. Las células deciduales, que son el resultado de la diferenciación del tejido endometrial materno, se caracterizan tanto por la acumulación de glucógeno y lípidos como por el aumento de la síntesis de ADN, ARN y proteínas, por su gran actividad metabólica y sintética hormonal. Se ha encontrado en la decidua placentaria expresión de ARN de distintos neuropéptidos/neurohormonas, (oxitocina, neuropéptido Y, somatostatina), factores de crecimiento (inhibinas, activinas y folistatinas, factor de crecimiento transformante, factor de crecimiento epidérmico, factores de crecimiento insulina-like), y citoquinas (interleuquinas e interferón) (Petraglia et al., 1996). La SP a nivel del núcleo de las células deciduales, podría desempeñar un papel de modulación de la expresión genética de todas las proteínas expresadas a nivel decidual. La decidua también podría contribuir al aporte de glucógeno junto con el aportado por las glándulas endometriales para el desarrollo del trofoblasto mediante la nutrición inicial histiotrófica de este tejido (Burton et al., 2002). Es probable que las células proliferativas del citotrofoblasto, requieran por su hipermetabolismo, una hiperglucogenólisis de forma similar a lo que ocurre en otros tejidos que proliferan de forma anormal. Las células tumorales tienen tasas de glucogenólisis 200 veces por encima de sus tejidos originarios. Se ha descrito en

el contexto de la fisiopatología de la SP en el cáncer, que la liberación de ésta proveniente de las células tumorales produce glucogenólisis y la glucosa obtenida sería utilizada por las células tumorales para aumentar su metabolismo (Munoz & Covenas, 2013a). Los antagonistas del RNK1 bloquean la glucogenólisis en las células tumorales contrarrestando así el efecto Warburg (Medrano et al., 1994). De igual modo, en el caso de la mola hidatidiforme, la SP podría desencadenar la glucogenólisis que favorecería la proliferación trofoblástica que caracteriza a esta entidad. El fenómeno por el que las células tumorales producen energía por una alta tasa de glucogenólisis seguida por una fermentación láctica sin anaerobiosis, fue descrito por Warburg (Warburg, 1956).

Hemos descrito también, aunque con menor intensidad, tinción citoplasmática para la SP en todos los tipos celulares referidos anteriormente, acorde a la internalización del complejo SP-RNK1 mediante los señalosomas tempranos dependientes de clatrina, que circulan a una localización perinuclear, donde el complejo del endosoma se disocia por acidificación y la SP empieza a degradarse en las vesículas perinucleares por ECE-1 (Cottrell et al., 2009). Esta localización citoplasmática de la SP que observamos, fue descrita por Grady que estudió la endocitosis del complejo SP-NK1 y la vía endocelular de los endosomas tempranos y tardíos determinando el reciclado de los receptores y la localización y degradación de la SP, a través de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia. Una vez que se evidencia la internalización del receptor y de la SP en vesículas bajo la membrana plasmática constituyendo los endosomas tempranos, conforme transcurre el tiempo tras la incubación de las células, las vesículas con colocalización de SP y RNK1 se sitúan a nivel perinuclear, y con posterioridad, desaparece la inmunorreactividad de RNK1 a nivel intracelular y aparece a nivel de membrana como consecuencia del reciclado de los receptores, perdiéndose también la señal de inmunofluorescencia de SP a nivel del citoplasma tras su degradación (Grady et al., 1995).

Hemos descrito la inmunolocalización del RNK1 con un predominio eminentemente citoplasmático en todas las poblaciones celulares, apreciando también refuerzo de la tinción a nivel de la membrana plasmática, dado el circuito conocido desde la membrana celular hasta la región perinuclear que hemos descrito previamente.

Hemos encontrado expresión del RNK1 a nivel de los macrófagos estromales, fundamentalmente a nivel citoplasmático, aunque también con expresión débil a nivel nuclear. Igualmente hemos encontrado tinción débil nuclear a nivel del trofoblasto

intermedio. Estos hallazgos son similares a los publicados en la bibliografía en la célula de Hofbauer de la placenta humana (Munoz et al., 2013), en la que se describía por primera vez la localización nuclear del RNK1 en la placenta humana.

A nivel decidual encontramos expresión débil de RNK1 a nivel nuclear, ya descrita con anterioridad a nivel placentario (Munoz, Pavon, et al., 2010).

Con estos hallazgos del RNK1 a nivel del núcleo, que ya se ha evidenciado en otros tipos de células (Esteban et al., 2009; Gonzalez Moles et al., 2009; Munoz et al., 2013; Munoz, Gonzalez-Ortega, Rosso, et al., 2012; Munoz, Gonzalez-Ortega, et al., 2014; Munoz, Pavon, et al., 2010), podemos inferir que es necesaria la unión de la SP a nivel nuclear con el RNK1, para poder realizar su función de neuromodulación genética. Hemos encontrado una tinción más débil del RNK1 a nivel nuclear, lo que nos indica una menor expresión de RNK1 que de SP a nivel nuclear. Es posible que el menor número de receptores a nivel nuclear implique un nuevo mecanismo de control sobre la acción de la SP, regulando su actuación como factor epigenético en el núcleo. Actualmente se sabe que la mola es una enfermedad genética, pero los hallazgos que hemos encontrado en las células de la mola indicarían que existen factores neuroepigenéticos implicados en el desarrollo de esta enfermedad.

La participación de la SP y el RNK1 en los mecanismos fisiopatológicos del desarrollo de la mola y de la ETG, como los descritos anteriormente, apoyaría la hipótesis de que la SP podría considerarse como una molécula correguladora de la comunicación intercelular paracrina, exportando el concepto planteado por Hökfelt a nivel del SNC sobre la cotransmisión y coexistencia de NP que modulan las acciones de forma positiva o negativa de otros NP liberados en las sinapsis modificando los efectos tras la unión a los receptores (Hökfelt, Lundberg, et al., 1980). Del mismo modo, la existencia de la SP, puede modular la señalización intracelular y las vías efectoras de otras moléculas implicadas en la fisiopatología de la mola hidatidiforme.

La clínica cardinal de la mola hidatidiforme tanto es la metrorragia, en un 84% en los casos de la mola completa y un 75% de los casos de la mola parcial (Hou et al., 2008; Lurain, 2010), de modo que las pacientes con mola parcial presentan síntomas de aborto incompleto hasta en el 90% de los casos (Lurain, 2010). Aunque existe controversia sobre si la mola completa puede considerarse un proceso abortivo, sí se conoce que la triploidía de la mola parcial puede considerarse causa de aborto de origen cromosómico.

Se ha descrito la intermediación de SP y RNK1 en los abortos desencadenados por estrés como consecuencia del aumento de SP que induce un rechazo fetal por la inducción de una respuesta inmune proinflamatoria mediado por TNF- α (Fest et al., 2006). Por tanto, sería importante valorar qué implicación podría tener la expresión de SP de la mola hidatidiforme en los mecanismos etiopatogénicos del aborto en esta patología, aunque la causa de aborto en la mola sea de origen cromosómico.

Un aspecto clínico de relevancia en la mola hidatidiforme que puede estar en relación con los hallazgos de nuestro trabajo, es la preeclampsia.

La prevalencia de la preeclampsia recogida en series de pacientes en los años 1970-1980 era de hasta un 27%, cuando las molas no eran tratadas hasta el segundo trimestre, con un descenso posterior hasta el 1% debido a los avances en el diagnóstico (Soto-Wright et al., 1995). Sin embargo, la mola hidatidiforme hoy sigue siendo la causa más probable de preeclampsia de instauración muy precoz (Koga et al., 2010; Prasannan-Nair, Reynolds, & Budden, 2006).

Aunque está bien establecido que la gestación molar predispone a las mujeres a la preeclampsia, se conoce poco sobre los mecanismos fisiopatológicos por los que la preeclampsia se produce en esta enfermedad (Koga et al., 2010; Zhao et al., 2013). Se ha propuesto que la mola puede ser el resultado de la exposición a factores angiogénicos (Hsieh et al., 1994).

Es bien conocido que la preeclampsia está relacionada con los niveles aumentados circulantes de factores antiangiogénicos, que son producidos por el trofoblasto y secretados a la circulación materna, causando activación de las células endoteliales maternas.

El disbalance entre los factores angiogénicos, como el VEGF, y de factores antiangiogénicos como la endoglina soluble (sEndoglina) que es un antagonista de factor de crecimiento transformante β (TGF β) y el *Soluble Fms-Like Tyrosine kinase 1* (sFlt-1) que es un antagonista de VEGFR, se han propuesto en la fisiopatología de la preeclampsia en la mola hidatidiforme (Espinoza et al., 2009; Levine et al., 2004; Maynard et al., 2003; C. J. Robinson, Johnson, Chang, Armstrong, & Wang, 2006).

El proceso de angiogénesis está regulado por tres familias de factores de crecimiento: VEGF, angiopoetinas y efrinas (Gale & Yancopoulos, 1999). Algunos otros factores como TGF β y sus correceptores (endoglinas), también están implicados en el proceso de

angiogénesis demostrándose niveles altos de expresión de TGF β en la mola completa (Bolat et al., 2010), lo que podría conllevar una alteración en la placentación. La Endoglina es un antagonista de TGF β y también presenta niveles elevados de expresión en la mola hidatidiforme y en la preeclampsia (Kanter et al., 2010; Koga et al., 2010).

La regulación de VEGF por los factores antiangiogénicos es esencial para el éxito de la gestación (Clark et al., 1998). Un exceso de factores antiangiogénicos (sEndoglin and sFlt-1has), ha sido descrito en pacientes con mola hidatidiforme (Koga et al., 2010). Se ha publicado en algunos estudios que los niveles circulantes de sEndoglina está aumentados en la mola parcial y completa con preeclampsia y que los niveles de Flt-1/sFlt-1 están incrementados en la placenta de la mola hidatidiforme sugiriendo que esto está asociado con la preeclampsia de instauración temprana (Kanter et al., 2010). Los niveles circulantes maternos de sFlt-1 también se encuentran incrementados en la mola hidatidiforme (Koga et al., 2010). sFLT-1 es una variante del receptor VEGF 1 que se produce en una variedad importante de tejidos. sFlt-1 actúa como un receptor de VEGF y regula su biodisponibilidad, antagonizando o disminuyendo los niveles libres circulantes de VEGF. VEGF es un factor angiogénico muy potente y es crítico para el crecimiento endotelial y la integridad vascular junto con otros factores angiogénicos. Puede producir consecuentemente disfunción endotelial (Lam, Lim, & Karumanchi, 2005; Maynard et al., 2003).

Se ha demostrado que el ARNm de VEGF está aumentado de forma significativa en la mola completa y en la mola parcial con respecto a las placentas normales sin diferencia de expresión entre los dos subtipos de molas (Zhao et al., 2013), y que es producido por el trofoblasto hiperproliferativo (Ahmed et al., 1995; Nagymanyoki et al., 2008). La asociación de la mola hidatidiforme con la preeclampsia de implantación precoz, podría deberse a los niveles aumentados de VEGF (Zhao et al., 2013).

El desarrollo de los capilares de la placenta está restringido tanto en la mola completa como en la mola parcial como consecuencia de una inadecuada perfusión. Dado que la expresión de sFlt-1 está estimulado por la hipoxia, sFlt-1 puede actuar inhibiendo la actividad de VEGF en estas condiciones (Koga et al., 2010).

Distintos autores han referido el papel fundamental que en la adaptación hemodinámica uteroplacentaria, tendrían las TK, y más concretamente las NK y sus receptores, en situaciones patológicas placentarias como la preeclampsia.

De Graf apoya el papel de los NP tanto a nivel de la regulación del flujo placentario como de la secreción hormonal, demostrando inmunorreactividad de SP a nivel de las células deciduales de la placenta (Graf et al., 1996). Hansen, demuestra el efecto vasodilatador de la SP a nivel de las arterias del miometrio y de las vellosidades (Hansen, Maigaard, Allen, & Forman, 1988).

Numerosos autores han referido que las TK tendrían un papel en la adaptación uteroplacentaria hemodinámica, induciendo vasodilatación del útero y de la placenta. Inicialmente se atribuyó fundamentalmente a la NKB la relación con la fisiopatología de la preeclampsia. Page inicialmente planteó que los altos niveles de NKB en las mujeres con preeclampsia podían justificar la implicación fisiopatológica de la NKB en todas las complicaciones de esta patología bien a través de los RNK3 periféricos o bien a través de los RNK1 (Page et al., 2000; Page et al., 2001). Se postularon diferentes teorías sobre el efecto de la NKB, planteando que sus niveles aumentaban en la preeclampsia para mediar la liberación de óxido nítrico a través de RNK3 y así mejorar el flujo en la circulación placentaria (D'Anna et al., 2004), o que la NKB producía de forma preferencial vasodilatación a nivel de la circulación placentaria actuando directamente sobre las células endoteliales y que la elevación de sus niveles estaría más en relación con la regulación del flujo placentario (Laliberte et al., 2004). Brownbill propuso que el efecto vasodilatador de la NKB era ejercido mediante su unión al RNK1 dado que el RNK3 tenía una expresión ausente en la placenta (Brownbill et al., 2003).

Con posterioridad a estos estudios, ha sido descrita la expresión de SP y RNK1 en todas las células de la placenta y en las células endoteliales placentarias tanto del cordón umbilical como de las vellosidades (Munoz, Pavon, et al., 2010), por lo que parece evidente que la presencia de SP ha de mediar todas las funciones tanto proliferativas (Nilsson et al., 1985) como neoangiogénicas (Ziche, Morbidelli, Pacini, Geppetti, et al., 1990) inducidas por el complejo SP-RNK1.

Se sabe que los vasos placentarios carecen de innervación (Fox & Khong, 1990), así que el control del tono vasomotor y del flujo placentario estaría regulado por otros mecanismos diferentes al sistema nervioso. Por tanto, la resistencia vascular debe ser controlada por factores humorales y mecanismos autocrinos o paracrinos en los que participaría la SP a través del RNK1, conociéndose que el efecto mediado a través de RNK1 es vasodilatador, regulando el flujo regional sanguíneo en la placenta (Marzioni et

al., 2005). También se conoce que las células endoteliales liberan SP en la vena umbilical humana en respuesta al aumento de flujo vascular, lo que demuestra que las células endoteliales pueden liberar moléculas neurotransmisoras en situaciones patológicas. Esto permitiría la acción local de la SP ejerciendo una regulación neuropeptidérgica en ausencia de regulación neural, uniéndose al receptor de la célula endotelial ejerciendo un rápido control sobre el flujo tisular (Milner et al., 1990).

Nosotros describimos por primera vez, la expresión de SP y el RNK1 en la mola hidatidiforme humana completa y parcial, que es un patología que puede estar asociada a la preeclampsia. Como hemos referido previamente, en la mola hidatidiforme se produce una expresión aumentada de factores angiogénicos por un defecto de la placentación que da lugar a una alteración de la perfusión placentaria. Esta situación provoca la secreción de factores antiangiogénicos que antagonizan la acción de los factores angiogénicos, concretamente al VEGF, lo que implicaría un defecto del crecimiento endotelial y la integridad vascular teniendo como consecuencia una disfunción endotelial. En este contexto ante la presencia de SP y RNK1, parece evidente que el complejo ejercería en esta situación fisiopatológica una regulación del flujo placentario pues, a pesar de que la función endotelial en las placentas con preeclampsia está alterada, la SP sigue ejerciendo sus efectos vasodilatadores (Wimalasundera, Thom, Regan, & Hughes, 2005). Por tanto, es posible que esta situación provocada por la alteración en la implantación del trofoblasto induzca una sobreexpresión de SP y RNK1 produciendo vasodilatación para intentar controlar el aporte sanguíneo placentario.

Además de esta regulación local la SP y el RNK1 podrían estar implicados en las complicaciones de la preeclampsia. Page propone que el aumento de niveles séricos de la NKB liberada por la placenta encontrado en las mujeres con preeclampsia a través del RNK3, sería el responsable de inducir vasoconstricción de forma endocrina y por tanto hipertensión arterial materna con el fin de optimizar el flujo placentario (Page, 2010). Los síntomas característicos de la preeclampsia como son la trombocitopenia, edemas y la eclampsia, finalmente podrían estar mediados por el complejo SP-RNK1 (Page, 2010; Page & Lowry, 2000).

Se postula que la expresión de SP y RNK1 en la célula de Hofbauer (Munoz et al., 2013) está implicada en la regulación de la angiogénesis de las vellosidades placentarias a través de la síntesis de VEGF (Khan et al., 2000). En el caso de la mola hidatidiforme, la

disminución del número de macrófagos explicaría también la disminución de la vascularización del estroma.

El estudio de la SP y el RNK1 en la mola hidatidiforme humana, sugiere la importancia de este NP en la fisiopatología de este proceso proliferativo y en sus complicaciones más graves. El conocimiento sobre la mola hidatidiforme y la regulación neuropeptidérgica de su proliferación amplía el espectro terapéutico para esta entidad de comportamiento potencialmente maligno. La implicación de la SP y de los RNK1 en la fisiopatología de la mola ampliaría la causas que regulan la enfermedad trofoblástica, existiendo una causa neuroepigenética mediada por SP y RNK1, además de la causa genética. Esto significaría desde el punto de vista terapéutico que podríamos actuar con antagonistas de RNK1 sobre la evolución de la enfermedad trofoblástica impidiendo los fenómenos fisiopatológicos mediados por la SP como son la proliferación, la diferenciación, la migración y la supervivencia celular.

VI. RESUMEN

La mola hidatidiforme humana es una alteración de la gestación, conceptualmente encuadrada en el momento actual como una de las cuatro entidades clinicopatológicas que constituyen la enfermedad trofoblástica gestacional (ETG). La ETG comprende un espectro de procesos malignos y benignos poco frecuentes, derivados de una proliferación anormal de la placenta humana (hiperplasia) como consecuencia de una fecundación anormal con un exceso de dotación del genoma paterno y una contribución materna ocasional.

La mola hidatidiforme humana constituye un proceso proliferativo que presenta potencial de invasividad y metástasis, dando lugar en esas circunstancias a la neoplasia trofoblástica gestacional.

La SP es un NP de la familia de las TK se localiza a nivel del SNC y del sistema nervioso periférico. Se ha descrito no obstante su expresión en localizaciones carentes de innervación como en células del sistema inmune, células endoteliales, células de Leydig y ováricas sin innervación en tejidos no innervados como la placenta. La SP y el RNK1 están implicados en la fisiopatología de múltiples procesos proliferativos tumorales y premalignos, mediante sus acciones sobre la proliferación, la angiogénesis, la migración e invasión y la supervivencia celular.

Se ha valorado la expresión e inmunolocalización de la SP y el RNK1, mediante técnicas de inmunohistoquímica en 30 casos de molas hidatidiformes. Las muestras fueron obtenidas mediante legrado por aspiración y el diagnóstico realizado mediante examen morfológico, inmunohistoquímica de proteína p57 en todos los casos y cariotipo en 8 casos.

Describimos por primera vez en la mola hidatidiforme humana la expresión de la SP y el RNK1 en todas las poblaciones celulares, lo que tiene importantes implicaciones en el estudio de la fisiopatología de la mola hidatidiforme.

El hecho de que la mola sea un tejido no innervado, indica que la SP y el RNK1 mediante mecanismos autocrinos, paracrinos y endocrinos, realizarían una neuromodulación genética de la mitogénesis, metástasis, invasividad y supervivencia de las células.

Describimos en nuestro estudio el predominio de expresión nuclear de la SP que indica la actuación a dicho nivel de este NP. La expresión de RNK1 aunque es fundamentalmente citoplasmática, también está presente en el núcleo lo que puede

implicar un nuevo mecanismo de control sobre la acción de la SP, regulando su actuación como factor epigenético en el núcleo.

Estos hallazgos tienen una implicación terapéutica fundamental, pues mediante los antagonistas del RNK1, podrían bloquearse todos los efectos fisiopatológicos que la SP a través del RNK1 produce en la mola hidatidiforme, pudiendo así modificar la evolución y pronóstico de la enfermedad.

VII. CONCLUSIONES

- 1.** Se demuestra por primera vez, la presencia de la SP y del RNK1 en la mola hidatidiforme humana.
- 2.** La localización de la SP y del RNK1 es citoplasmática y nuclear, siendo la localización de la SP preferentemente nuclear y la de RNK1 preferentemente citoplasmática.
- 3.** La mayor presencia de la SP en el núcleo se traduce en que desempeña una mayor función nuclear que a nivel citoplasmático.
- 4.** La SP desempeña en el núcleo de las células de la mola una función neuroreguladora genética, regulando la expresión de ciertos genes relacionados con la proliferación.
- 5.** La presencia de RNK1 en el núcleo significa que la SP regularía su función neuroreguladora genética después de su unión a RNK1.
- 6.** La presencia de la SP y de RNK1 en las células de la mola humana, se traduce en una función autocrina y paracrina de las células de la mola a través del complejo SP-RNK1.
- 7.** La SP a través de RNK1 estaría regulando de forma autocrina y paracrina la proliferación de las células de la mola.
- 8.** Asimismo la SP a través de RNK1 estaría regulando la migración de las células de la mola, lo que implicaría regulación de la infiltración y de las metástasis de la mola.
- 9.** La expresión de RNK1 en las células de la mola puede ser útil para la intervención terapéutica con antagonistas de RNK1 para inhibir la proliferación, la invasión y metástasis de las células de la mola.
- 10.** La presencia de la SP en los núcleos de las células del sincitiotrofoblasto de la mola que tienen células totalmente diferenciadas que han abortado el sistema de proliferación celular, estaría contribuyendo a la apoptosis o a la muerte celular programada de las células del sincitiotrofoblasto.
- 11.** La implicación de la SP y de los RNK1 en la fisiopatología de la mola ampliaría las causas que regulan la enfermedad trofoblástica, a una causa neuroepigenética mediada por SP y RNK1, además de la genética ya conocida.
- 12.** La presencia de RNK1 en la mola hidatidiforme humana contribuye a la mejor comprensión de la fisiopatología de la mola.

VIII. ANEXOS

ANEXO I



Servicio Andaluz de Salud
CONSEJERÍA DE SALUD Y BIENESTAR SOCIAL

INFORME DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE CENTRO H.U. VIRGEN DEL ROCIO

El Comité de Ética de la Investigación de Centro H.U. Virgen del Rocío de Sevilla, en Sesión celebrada el día veinticuatro de abril de dos mil trece (Acta 04/13):

1. Ha procedido a la revisión del estudio:
 - Código de CEI: **2013PI/087**
 - Presentado por **Dra. Dña. Ana Isabel Garrido Ocaña**
 - Titulado: **“Inmunolocalización de la sustancia P y del receptor NK1 en la mola hidatidiforme humana”.**
2. Tras su valoración procede a emitir **INFORME FAVORABLE** del mismo.

Y para que conste y surta los efectos oportunos se expide la presente certificación en Sevilla, a seis de mayo de dos mil trece

Fdo.: Fco. Javier Bautista Paloma
Presidente



Hospital Universitario VIRGEN DEL ROCÍO
AVDA. MANUEL SIURROT, S/N - 41013 - SEVILLA

ANEXO II



Biobanco Sistema Sanitario Público de Andalucía

ACUERDO DE CESIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA INVESTIGACIÓN

Código de solicitud: 5313CC13

En Sevilla, a Octubre de 2013

REUNIDOS

De una parte, D. D^{ña}. Blanca Miranda Serrano, con NIF 05.356.518-W, Coordinadora del Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía, con domicilio a efectos del presente acuerdo en el Parque Tecnológico Ciencias de la Salud, Centro de Investigación Biomédica, de Armilla (Granada).

Y de otra, D. /D^{ña}. Ana Isabel Garrido Ocaña, responsable de la investigación (en adelante destinatario), con domicilio a estos efectos en Hospital Universitario Virgen del Rocío, sito en Av/ Manuel Siurot s/n, Sevilla.

Las partes se reconocen recíprocamente la capacidad jurídica necesaria para suscribir el presente acuerdo, y, a tal efecto,

EXPONEN

Primero.- En el seno del Servicio Andaluz de Salud (SAS) se ha organizado el Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía (en lo sucesivo Biobanco del SSPA), establecimiento público, sin ánimo de lucro, que conserva y distribuye diversas muestras biológicas, las cuales constituyen un excelente elemento para la investigación biomédica.

Segundo.- El destinatario, como responsable de la investigación, adscrito a Hospital Universitario Virgen del Rocío, de conformidad con lo dispuesto en la normativa vigente, solicitó, en fecha 21 de Marzo de 2013, las muestras biológicas y/o datos indicados en el Anexo de este acuerdo al SAS, a través del Biobanco del SSPA, para la realización de un proyecto de investigación.

Tercero.- En dicha solicitud consta el proyecto y la misma se acompañaba del dictamen favorable del Comité de Ética de la Investigación del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla, y Comité Científico que evaluaron el proyecto.

Cuarto.- La cesión ha sido informada de forma positiva por el Comité Científico y de Ética del Biobanco, así como por la persona titular de la dirección científica del mismo.

Quinto.- De conformidad con lo anterior, y en cumplimiento de lo dispuesto en la normativa vigente, las partes convienen la firma del presente acuerdo de cesión de muestras biológicas, según las siguientes

ESTIPULACIONES

PRIMERA.- OBJETO

El objeto de este acuerdo es regular la cesión de muestras biológicas y los datos asociados a las mismas (en adelante muestras biológicas) por parte del SAS (cedente), a través del Biobanco del SSPA al destinatario.

Las muestras biológicas que se ceden en virtud de este acuerdo son las que se especifican en el Anexo. Las muestras biológicas a las que se refiere el presente acuerdo incluirán las muestras y los subproductos derivados.

A partir de la firma del presente acuerdo, el destinatario estará autorizado para el empleo de las muestras biológicas en el proyecto de investigación **Inmunolocalización de la sustancia P y del receptor NK1 en la mola hidatidiforme humana**, que consiste en

ANTECEDENTES:

Ha sido demostrado que la sustancia P actúa como mitógeno en múltiples líneas celulares que expresan receptores NK-1 (glioma, retinoblastoma, neuroblastoma, melanoma, carcinoma laríngeo, tumores gastrointestinales, leucemias linfoblásticas). Recientemente, ha sido publicada la existencia de SP en células de placenta de neonatos a término de partos vaginales normales sin signos histológicos de corioamnionitis, villitis o funiculitis, localizándose en el citoplasma y en el núcleo celular (Muñoz et al. 2010). Esta demostración de la SP y los receptores NK-1 tiene implicaciones funcionales importantes, sugiriendo que ambos desarrollan un papel en la fisiología placentaria. Este hallazgo apoyaría la idea de que la sustancia P puede actuar a través del receptor NK-1 mediante mecanismos autocrinos, paracrinos o endocrinos. La SP podría tener un papel en la regulación local del flujo sanguíneo y en la implantación placentaria normal debido a que induce proliferación celular y neoangiogénesis. Por otro lado, la disregulación del sistema SP/receptor NK-1 podría desencadenar patología de la gestación. A pesar de todo este conocimiento, en la actualidad no existen publicaciones sobre la identificación de la expresión de receptores NK-1 y SP en procesos proliferativos anormales del trofoblasto de la placenta humana, tales como la mola hidatidiforme, por lo que este campo está abierto a la investigación en la identificación y función del referido sistema SP/receptor NK-1 en esta patología de la gestación.

HIPÓTESIS:

Es conocido que la SP es un neuropéptido que al unirse a su receptor NK1 regula numerosas funciones biológicas. Así mismo ha sido descrito que la SP y el receptor NK1 se expresa en placentas humanas normales (Muñoz et al 2010). Probablemente ambos, SP y receptor NK1, estén expresados en molas hidatidiformes humanas.

OBJETIVO:

Investigar la presencia y distribución de SP y su receptor NK1 mediante la técnica de inmunohistoquímica en la mola hidatidiforme humana.

SEGUNDA.- OBLIGACIONES DEL DESTINATARIO

El destinatario queda obligado a:

- a) Usar las muestras biológicas de acuerdo con la normativa de aplicación y especialmente con lo preceptuado en la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica, el Real Decreto 1716/2011, de 18 de noviembre, por el que se establecen los requisitos básicos de autorización y funcionamiento de los biobancos con fines de investigación biomédica y del tratamiento de las muestras biológicas de origen humano, y se regula el funcionamiento y organización del Registro Nacional de Biobancos para investigación biomédica, así como, en su caso, la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal, y la Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica, en lo que resulte de aplicación, y a llevar a cabo las actividades de investigación respetando en todo caso las medidas de precaución necesarias.
- b) Utilizar las muestras biológicas con el fin único y exclusivo de llevar a cabo el proyecto de investigación indicado en la estipulación primera, quedando prohibido usar las mismas fuera de dicho proyecto, así como ceder completa o parcialmente las muestras objeto de este acuerdo a cualquier tercero.
- c) Asegurar la trazabilidad de las muestras biológicas mientras estén en su poder.
- d) Garantizar la disponibilidad de la información genética validada y relevante para la salud que, en su caso, se obtenga del análisis de las muestras biológicas.
- e) Observar el reglamento interno de funcionamiento del Biobanco del SSPA, publicado en su página web, en lo que resulte aplicable.
- f) Destruir o devolver al SAS, a través del Biobanco del SSPA, el excedente que pudiera existir una vez finalizado el proyecto, siguiendo las indicaciones de dicha institución, que podrá solicitar su devolución si se trata de muestras infrecuentes o de las que se tenga poca cantidad.

- g) Devolver al SAS, a través del Biobanco del SSPA, las muestras biológicas cedidas en el supuesto de que no fueran utilizadas o el proyecto no fuese desarrollado en el plazo de 6 meses, corriendo con los gastos derivados de dicha devolución.
- h) Identificar adecuadamente al Biobanco del SSPA como la fuente de la que ha obtenido las muestras biológicas en toda publicación o comunicación sobre las investigaciones en que se hayan utilizado dichas muestras.
- i) Comunicar al Biobanco del SSPA los resultados del proyecto de investigación para facilitar el correcto seguimiento de los resultados derivados de los estudios realizados con las muestras, de conformidad con lo establecido en la estipulación cuarta.
- j) Asegurar que todas las personas que participen en el proyecto de investigación usarán las muestras únicamente en los términos reflejados en el presente documento, comprometiéndose a velar para que todas las personas que colaboren en el proyecto cumplan este compromiso.
- k) Asumir el coste derivado de la entrega de las muestras biológicas, de conformidad con lo dispuesto en la estipulación siguiente.

TERCERA.- ENVÍO DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS Y REPERCUSIÓN DE COSTES

Las muestras biológicas serán enviadas al destinatario, a la dirección indicada en el presente documento, asumiendo éste los costes derivados del envío de las muestras biológicas, así como la parte proporcional de los gastos derivados de la obtención, mantenimiento, manipulación y otros gastos de similar naturaleza, de conformidad con la normativa vigente, según tarifas publicadas en la página web del Biobanco del SSPA y/o, en su caso, los precios públicos que resultaran aplicables.

La Fundación Pública Andaluza Progreso y Salud, entidad gestora del Biobanco del SSPA, emitirá la correspondiente factura, derivada de las actividades relacionadas con el presente acuerdo, que deberá ser abonada por el destinatario en el plazo de treinta (30) días desde la recepción de la misma en la cuenta bancaria 0182 5566 79 0011503217, de la que la Fundación Pública Andaluza Progreso y Salud es titular.

De conformidad con el artículo 34.3 del Real Decreto 1716/2011, de 18 de noviembre, las muestras biológicas y los datos asociados sólo se cederán, por regla general, de forma anónima o disociada. Si la naturaleza del proyecto de investigación requiriese disponer de datos clínicos adicionales acerca de los sujetos fuente, el Biobanco del SSPA coordinará la obtención de esta información con el centro donde se obtuvo la muestra, siempre que ésta no haya sido anonimizada.

CUARTA.- COMUNICACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN

El destinatario se compromete a enviar al SAS, a través del Biobanco del SSPA, en el plazo de seis (6) meses desde la finalización del proyecto, una memoria de la investigación realizada con las conclusiones generales del estudio, siempre y cuando el autor haya publicado los resultados o se haya desestimado o renunciado a dicha publicación.

El SAS podrá hacer públicas dichas conclusiones, siempre que ello no suponga una interferencia de cara a la protección de los derechos de propiedad industrial o intelectual derivados de los resultados del proyecto.

Asimismo, el destinatario enviará al SAS, a través del Biobanco, transcurridos 2 años desde la finalización del proyecto de investigación, una copia de los artículos científicos publicados que se deriven de la investigación realizada empleando las muestras biológicas a las que se refiere el presente acuerdo.

El destinatario se compromete a comunicar al SAS, a través del Biobanco del SSPA, cualquier dato clínicamente relevante del sujeto fuente y/o de sus familiares, siempre que las muestras biológicas no hayan sido anonimizadas con carácter previo a la cesión.

El SAS se reserva el derecho de recabar informes del destinatario y a los miembros del equipo del proyecto acerca de la utilización de las muestras biológicas y realizar un seguimiento de los resultados obtenidos con las mismas.

QUINTA.- DERECHOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL Y/O INTELECTUAL Y EXPLOTACIÓN DE RESULTADOS

[Se elegirá a) ó b), según el caso]

a) Para el supuesto de que la intervención del SAS se limite a ceder las muestras biológicas, a través del Biobanco del SSPA:

La intervención del SAS se limita a ceder, a través del Biobanco del SSPA, muestras biológicas para el desarrollo del proyecto. Por tanto, los derechos de explotación de los resultados obtenidos en el desarrollo del mismo, sean o no protegibles por derechos de propiedad industrial y/o intelectual, pertenecerán al destinatario o a la institución a la que esté adscrito, según corresponda de conformidad con la normativa aplicable en la materia, renunciando el SAS a ejercer cualquier reclamación respecto a dichos derechos.

b) Redacción para el supuesto de colaboración:

Si además de aportar las muestras biológicas, existe una colaboración entre las partes, la explotación de los resultados, protegibles o no, obtenidos en el desarrollo del proyecto en el que participen investigadores que desarrollan su actividad en el Biobanco y el destinatario se regulará en el oportuno convenio de colaboración que al efecto se suscriba entre las entidades a las que se encuentren adscritos. En dicho convenio se acordarán los términos de explotación industrial y/o intelectual y comercialización de dichos resultados, así como el régimen de cotitularidad sobre los mismos, que se determinarán en

proporción al esfuerzo y participación de las partes en el proyecto. Cualquiera de las partes vendrá obligada a comunicar inmediatamente y por escrito a la otra la obtención de dichos resultados de investigación.

SEXTA.- VIGENCIA

El presente acuerdo entrará en vigor en el momento de su firma y tendrá la vigencia del proyecto de investigación, salvo que sea extinguido de conformidad con lo dispuesto en la estipulación siguiente.

SÉPTIMA.- EXTINCIÓN DEL ACUERDO

El presente acuerdo quedará extinguido:

- a) Por mutuo acuerdo de las partes.
- b) Por finalizar la vigencia del presente acuerdo.
- c) Por falta de utilización de las muestras biológicas, según lo estipulado en la estipulación segunda de este acuerdo.
- d) Por el incumplimiento de las obligaciones derivadas del presente acuerdo, que no sea subsanado en el plazo de treinta (30) días siguientes a la recepción de la notificación escrita de la parte que aprecie el incumplimiento, identificando dicho incumplimiento y reclamando su subsanación.

Si el presente acuerdo fuera extinguido por cualquiera de dichos motivos y existiera un excedente de muestras biológicas, el destinatario procederá de acuerdo con las instrucciones del Biobanco del SSPA respecto a la devolución o destrucción de las mismas, asumiendo los costes derivados de la devolución o destrucción y comunicando de forma fehaciente tal extremo al Biobanco, una vez realizada la operación correspondiente.

ANEXO

MUESTRAS BIOLÓGICAS Y DATOS CLÍNICOS ASOCIADOS CEDIDOS

33130297 002-007	33130309 002-007
33130298 002-007	33130310 002-007
33130299 002-007	33130311 002-007
33130300 002-007	33130312 002-007
33130301 002-007	33130313 002-007
33130302 002-007	
33130303 002-007	
33130304 002-007	
33130305 002-007	
33130306 002-007	
33130307 002-007	
33130308 002-007	

CALENDARIO DE CESIÓN DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS

☒ Una única entrega. Fecha prevista: 20/05/2013

☐ Varias entregas. Fechas previstas:

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, T., & Dutta, A. (2009). p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer*, 9(6), 400-414. doi: 10.1038/nrc2657
- Agarwal, R., Teoh, S., Short, D., Harvey, R., Savage, P. M., & Seckl, M. J. (2012). Chemotherapy and human chorionic gonadotropin concentrations 6 months after uterine evacuation of molar pregnancy: a retrospective cohort study. *Lancet*, 379(9811), 130-135. doi: 10.1016/s0140-6736(11)61265-8
- Ahmed, A., Li, X. F., Dunk, C., Whittle, M. J., Rushton, D. I., & Rollason, T. (1995). Colocalisation of vascular endothelial growth factor and its Flt-1 receptor in human placenta. *Growth Factors*, 12(3), 235-243.
- Akopian, T. N., Arzumanyan, A. M., Agadzhanian, A. G., & Arutiunian, A. A. (1991). [Synaptosomal degradation of neuropeptides]. *Bioorg Khim*, 17(12), 1589-1604.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2014). *Molecular Biology of the Cell*, Sixth Edition: Taylor & Francis Group.
- Alex, G., Kunze, W. A., Furness, J. B., & Clerc, N. (2001). Comparison of the effects of neurokinin-3 receptor blockade on two forms of slow synaptic transmission in myenteric AH neurons. *Neuroscience*, 104(1), 263-269.
- Allen, J. M., Hoyle, N. R., Yeats, J. C., Ghatei, M. A., Thomas, D. G., & Bloom, S. R. (1985). Neuropeptides in neurological tumours. *J Neurooncol*, 3(3), 197-202.
- Allred, D. C., Clark, G. M., Elledge, R., Fuqua, S. A., Brown, R. W., Chamness, G. C., . . . McGuire, W. L. (1993). Association of p53 protein expression with tumor cell proliferation rate and clinical outcome in node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 85(3), 200-206.
- Allred, D. C., Harvey, J. M., Berardo, M., & Clark, G. M. (1998). Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol*, 11(2), 155-168.
- Almeida, T. A., Rojo, J., Nieto, P. M., Pinto, F. M., Hernandez, M., Martin, J. D., & Candenas, M. L. (2004). Tachykinins and tachykinin receptors: structure and activity relationships. *Curr Med Chem*, 11(15), 2045-2081.
- Angell, A. E., & Steiner, R. A. (2015). TACKling NKB's role in puberty. *Endocrinology*, 156(4), 1207-1209. doi: 10.1210/en.2015-1158
- Aoyama, M., Kawada, T., Fujie, M., Hotta, K., Sakai, T., Sekiguchi, T., . . . Satake, H. (2008). A novel biological role of tachykinins as an up-regulator of oocyte growth: identification of an evolutionary origin of tachykininergic functions in the ovary of the ascidian, *Ciona intestinalis*. *Endocrinology*, 149(9), 4346-4356. doi: 10.1210/en.2008-0323
- Armstrong, D. M., Pickel, V. M., Joh, T. H., Reis, D. J., & Miller, R. J. (1981). Immunocytochemical localization of catecholamine synthesizing enzymes and neuropeptides in area postrema and medial nucleus tractus solitarius of rat brain. *J Comp Neurol*, 196(3), 505-517. doi: 10.1002/cne.901960312
- Arnalich, F., Sanchez, J. F., Martinez, M., Jimenez, M., Lopez, J., Vazquez, J. J., & Hernanz, A. (1995). Changes in plasma concentrations of vasoactive neuropeptides in patients with sepsis and septic shock. *Life Sci*, 56(2), 75-81.
- Augustyniak, D., Jankowski, A., Mackiewicz, P., Skowrya, A., Gutowicz, J., & Drulis-Kawa, Z. (2012). Innate immune properties of selected human neuropeptides against

- Moraxella catarrhalis and nontypeable Haemophilus influenzae. *BMC Immunol*, 13, 24. doi: 10.1186/1471-2172-13-24
- Baergen, R. N. (2011). *Manual of Pathology of the Human Placenta: Second Edition*: Springer US.
- Baertschi, A. J., Zingg, H. H., & Dreifuss, J. J. (1981). Enkephalins, substance P, bradykinin and angiotensin II: differential sites of action on the hypothalamo-neurohypophyseal system. *Brain Res*, 220(1), 107-119.
- Baker, S. J., Morris, J. L., & Gibbins, I. L. (2003). Cloning of a C-terminally truncated NK-1 receptor from guinea-pig nervous system. *Brain Res Mol Brain Res*, 111(1-2), 136-147.
- Balan, R., Simion, N., Giusca, S. E., Grigoras, A., Gheuca-Solovastu, L., Gheorghita, V., . . . Caruntu, I. D. (2011). Immunohistochemical assessment of p16, COX-2 and EGFR in HPV-positive cervical squamous intraepithelial lesions. *Rom J Morphol Embryol*, 52(4), 1187-1194.
- Ballano, A. (1815). Diccionario de Medicina y Cirugía o Biblioteca manual médico-quirúrgica por D.A.B. . In F. M. Ávila (Ed.): Madrid.
- Bang, R., Sass, G., Kierner, A. K., Vollmar, A. M., Neuhofer, W. L., & Tiegs, G. (2003). Neurokinin-1 receptor antagonists CP-96,345 and L-733,060 protect mice from cytokine-mediated liver injury. *J Pharmacol Exp Ther*, 305(1), 31-39. doi: 10.1124/jpet.102.043539
- Barrett, K. E., Barman, S. M., Boitano, S., & Brooks, H. (2012). *Ganong's Review of Medical Physiology, 24th Edition*: McGraw-hill.
- Basturk, E., Kement, M., Yavuzer, D., Vural, S., Gezen, C., Gozu, H. I., . . . Oncel, M. (2012). The role of insulin-like growth factor 1 in the development of benign and malignant thyroid nodules. *Balkan Med J*, 29(2), 133-138. doi: 10.5152/balkanmedj.2011.034
- Beaujouan, J. C., Saffroy, M., Torrens, Y., Sagan, S., & Glowinski, J. (1999). Pharmacological characterization of tachykinin septide-sensitive binding sites in the rat submaxillary gland. *Peptides*, 20(11), 1347-1352.
- Beaujouan, J. C., Torrens, Y., Saffroy, M., Kemel, M. L., & Glowinski, J. (2004). A 25 year adventure in the field of tachykinins. *Peptides*, 25(3), 339-357. doi: 10.1016/j.peptides.2004.02.011
- Beer, S., Weighardt, H., Emmanuilidis, K., Harzenetter, M. D., Matevossian, E., Heidecke, C. D., . . . Holzmann, B. (2002). Systemic neuropeptide levels as predictive indicators for lethal outcome in patients with postoperative sepsis. *Crit Care Med*, 30(8), 1794-1798.
- Benirschke, K., Burton, G. J., & Baergen, R. N. (2012). *Pathology of the Human Placenta*: Springer.
- Benirschke, K., & Willes, L. (2010). Deportation of trophoblastic emboli to maternal lung: A source of cell-free DNA in maternal blood? *Chimerism*, 1(1), 15-18. doi: 10.4161/chim.1.1.12140
- Benson, C. B., Genest, D. R., Bernstein, M. R., Soto-Wright, V., Goldstein, D. P., & Berkowitz, R. S. (2000). Sonographic appearance of first trimester complete hydatidiform moles. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 16(2), 188-191. doi: 10.1046/j.1469-0705.2000.00201.x
- Berger, M., Neth, O., Ilmer, M., Garnier, A., Salinas-Martin, M. V., de Agustin Asencio, J. C., . . . Munoz, M. (2014). Hepatoblastoma cells express truncated neurokinin-1

- receptor and can be growth inhibited by aprepitant in vitro and in vivo. *J Hepatol*, 60(5), 985-994. doi: 10.1016/j.jhep.2013.12.024
- Berkowitz, R. S., Cramer, D. W., Bernstein, M. R., Cassells, S., Driscoll, S. G., & Goldstein, D. P. (1985). Risk factors for complete molar pregnancy from a case-control study. *Am J Obstet Gynecol*, 152(8), 1016-1020.
- Berkowitz, R. S., & Goldstein, D. P. (2009a). Clinical practice. Molar pregnancy. *N Engl J Med*, 360(16), 1639-1645. doi: 10.1056/NEJMcp0900696
- Berkowitz, R. S., & Goldstein, D. P. (2009b). Current management of gestational trophoblastic diseases. *Gynecol Oncol*, 112(3), 654-662. doi: 10.1016/j.ygyno.2008.09.005
- Berkowitz, R. S., & Goldstein, D. P. (2013). Current advances in the management of gestational trophoblastic disease. *Gynecol Oncol*, 128(1), 3-5. doi: 10.1016/j.ygyno.2012.07.116
- Berkowitz, R. S., Goldstein, D. P., & Bernstein, M. R. (1985). Natural history of partial molar pregnancy. *Obstet Gynecol*, 66(5), 677-681.
- Bifulco, C., Johnson, C., Hao, L., Kermalli, H., Bell, S., & Hui, P. (2008). Genotypic analysis of hydatidiform mole: an accurate and practical method of diagnosis. *Am J Surg Pathol*, 32(3), 445-451. doi: 10.1097/PAS.0b013e3181520034
- Bigioni, M., Benzo, A., Irrissuto, C., Maggi, C. A., & Goso, C. (2005). Role of NK-1 and NK-2 tachykinin receptor antagonism on the growth of human breast carcinoma cell line MDA-MB-231. *Anticancer Drugs*, 16(10), 1083-1089.
- Björklund, A., Hökfelt, T., & Kuhar, M. J. (1992). Neuropeptides in the CNS. In E. Science. (Ed.), *Handbook of Chemical Neuroanatomy* (Vol. 11). New York.
- Bjorndal, K., Larsen, S. R., Godballe, C., & Kroghdal, A. (2011). Osteopontin expression in salivary gland carcinomas. *J Oral Pathol Med*, 40(6), 451-455. doi: 10.1111/j.1600-0714.2010.00964.x
- Black, P. H. (2002). Stress and the inflammatory response: a review of neurogenic inflammation. *Brain Behav Immun*, 16(6), 622-653.
- Blanco Martínez, B. (2012). *La SP y el RNK1 en la esclerosis mesial temporal*. Sevilla, Sevilla.
- Bland-Sutton, J. (1911). *Tumours innocent and malignant. Their clinical characters and appropriate treatment*. (5^a ed.). Nueva York: Funk and Wagnalls Company.
- Bolat, F., Haberal, N., Tunalı, N., Aslan, E., Bal, N., & Tuncer, I. (2010). Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), hypoxia inducible factor 1 alpha (HIF-1alpha), and transforming growth factors beta1 (TGFbeta1) and beta3 (TGFbeta3) in gestational trophoblastic disease. *Pathol Res Pract*, 206(1), 19-23. doi: 10.1016/j.prp.2009.07.017
- Bost, K. L. (2004). Tachykinin-mediated modulation of the immune response. *Front Biosci*, 9, 3331-3332.
- Botz, B., Imreh, A., Sandor, K., Elekes, K., Szolcsanyi, J., Reglodi, D., . . . Helyes, Z. (2013). Role of Pituitary Adenylate-Cyclase Activating Polypeptide and Tac1 gene derived tachykinins in sensory, motor and vascular functions under normal and neuropathic conditions. *Peptides*, 43, 105-112. doi: 10.1016/j.peptides.2013.03.003
- Boyd, J. D., & Hamilton, W. J. (1970). *The human placenta*: Heffer.

- Bradesi, S., Eutamene, H., Garcia-Villar, R., Fioramonti, J., & Bueno, L. (2003). Stress-induced visceral hypersensitivity in female rats is estrogen-dependent and involves tachykinin NK1 receptors. *Pain*, 102(3), 227-234.
- Brener, S., Gonzalez-Moles, M. A., Tostes, D., Esteban, F., Gil-Montoya, J. A., Ruiz-Avila, I., . . . Munoz, M. (2009). A role for the substance P/NK-1 receptor complex in cell proliferation in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res*, 29(6), 2323-2329.
- Briese, J., Sudahl, S., Schulte, H. M., Loning, T., & Bamberger, A. M. (2005). Expression pattern of the activating protein-1 family of transcription factors in gestational trophoblastic lesions. *Int J Gynecol Pathol*, 24(3), 265-270.
- Brownbill, P., Bell, N. J., Woods, R. J., Lowry, P. J., Page, N. M., & Sibley, C. P. (2003). Neurokinin B is a paracrine vasodilator in the human fetal placental circulation. *J Clin Endocrinol Metab*, 88(5), 2164-2170. doi: 10.1210/jc.2002-021727
- Bueno, I. (2014). *Niveles de sustancia P en sangre de cordón umbilical en neonatos sanos a término* Sevilla.
- Burssens, P., Steyaert, A., Forsyth, R., van Ovost, E. J., Depaepe, Y., & Verdonk, R. (2005). Exogenously administered substance P and neutral endopeptidase inhibitors stimulate fibroblast proliferation, angiogenesis and collagen organization during Achilles tendon healing. *Foot Ankle Int*, 26(10), 832-839.
- Burton, G. J., Jauniaux, E., & Charnock-Jones, D. S. (2007). Human early placental development: potential roles of the endometrial glands. *Placenta*, 28 Suppl A, S64-69. doi: 10.1016/j.placenta.2007.01.007
- Burton, G. J., Jauniaux, E., & Watson, A. L. (1999). Maternal arterial connections to the placental intervillous space during the first trimester of human pregnancy: the Boyd collection revisited. *Am J Obstet Gynecol*, 181(3), 718-724.
- Burton, G. J., Scioscia, M., & Rademacher, T. W. (2011). Endometrial secretions: creating a stimulatory microenvironment within the human early placenta and implications for the aetiopathogenesis of preeclampsia. *J Reprod Immunol*, 89(2), 118-125. doi: 10.1016/j.jri.2011.02.005
- Burton, G. J., Watson, A. L., Hempstock, J., Skepper, J. N., & Jauniaux, E. (2002). Uterine glands provide histiotrophic nutrition for the human fetus during the first trimester of pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*, 87(6), 2954-2959. doi: 10.1210/jcem.87.6.8563
- Buza, N., & Hui, P. (2014). Immunohistochemistry and other ancillary techniques in the diagnosis of gestational trophoblastic diseases. *Semin Diagn Pathol*, 31(3), 223-232. doi: 10.1053/j.semdp.2014.03.004
- Caberlotto, L., Hurd, Y. L., Murdock, P., Wahlin, J. P., Melotto, S., Corsi, M., & Carletti, R. (2003). Neurokinin 1 receptor and relative abundance of the short and long isoforms in the human brain. *Eur J Neurosci*, 17(9), 1736-1746.
- Cahill, C. M., & Coderre, T. J. (2002). Attenuation of hyperalgesia in a rat model of neuropathic pain after intrathecal pre- or post-treatment with a neurokinin-1 antagonist. *Pain*, 95(3), 277-285.
- Candelier, J. J., Frappart, L., Yadaden, T., Poaty, H., Picard, J. Y., Prevot, S., & Coullin, P. (2013). Altered p16 and Bcl-2 expression reflects pathologic development in hydatidiform moles and choriocarcinoma. *Pathol Oncol Res*, 19(2), 217-227. doi: 10.1007/s12253-012-9572-2

- Candenas, L., Lecci, A., Pinto, F. M., Patak, E., Maggi, C. A., & Pennefather, J. N. (2005). Tachykinins and tachykinin receptors: effects in the genitourinary tract. *Life Sci*, 76(8), 835-862. doi: 10.1016/j.lfs.2004.10.004
- Cascieri, M. A., Huang, R. R., Fong, T. M., Cheung, A. H., Sadowski, S., Ber, E., & Strader, C. D. (1992). Determination of the amino acid residues in substance P conferring selectivity and specificity for the rat neurokinin receptors. *Mol Pharmacol*, 41(6), 1096-1099.
- Castagliuolo, I., Valenick, L., Liu, J., & Pothoulakis, C. (2000). Epidermal growth factor receptor transactivation mediates substance P-induced mitogenic responses in U-373 MG cells. *J Biol Chem*, 275(34), 26545-26550. doi: 10.1074/jbc.M003990200
- Castellucci, M., & Kaufmann, P. (1982). A three-dimensional study of the normal human placental villous core: II. Stromal architecture. *Placenta*, 3(3), 269-285.
- Castellucci, M., Kosanke, G., Verdenelli, F., Huppertz, B., & Kaufmann, P. (2000). Villous sprouting: fundamental mechanisms of human placental development. *Hum Reprod Update*, 6(5), 485-494.
- Castellucci, M., & Zaccheo, D. (1989). The Hofbauer cells of the human placenta: morphological and immunological aspects. *Prog Clin Biol Res*, 296, 443-451.
- Castro-Obregon, S., Del Rio, G., Chen, S. F., Swanson, R. A., Frankowski, H., Rao, R. V., . . . Bredesen, D. E. (2002). A ligand-receptor pair that triggers a non-apoptotic form of programmed cell death. *Cell Death Differ*, 9(8), 807-817. doi: 10.1038/sj.cdd.4401035
- Castro-Obregon, S., Rao, R. V., del Rio, G., Chen, S. F., Poksay, K. S., Rabizadeh, S., . . . Bredesen, D. E. (2004). Alternative, nonapoptotic programmed cell death: mediation by arrestin 2, ERK2, and Nur77. *J Biol Chem*, 279(17), 17543-17553. doi: 10.1074/jbc.M312363200
- Ceballos, M. (1997). Péptidos neurotransmisores. In D. R. Andreu, L. (Ed.), *Péptidos en biología y biomedicina*: Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- Cejudo Roman, A., Pinto, F. M., Dorta, I., Almeida, T. A., Hernandez, M., Illanes, M., . . . Candenas, L. (2012). Analysis of the expression of neurokinin B, kisspeptin, and their cognate receptors NK3R and KISS1R in the human female genital tract. *Fertil Steril*, 97(5), 1213-1219. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.02.021
- Chang, M. M., & Leeman, S. E. (1970). Isolation of a sialogogic peptide from bovine hypothalamic tissue and its characterization as substance P. *J Biol Chem*, 245(18), 4784-4790.
- Chang, M. M., Leeman, S. E., & Niall, H. D. (1971). Amino-acid sequence of substance P. *Nat New Biol*, 232(29), 86-87.
- Chauhan, V. S., Kluttz, J. M., Bost, K. L., & Marriott, I. (2011). Prophylactic and therapeutic targeting of the neurokinin-1 receptor limits neuroinflammation in a murine model of pneumococcal meningitis. *J Immunol*, 186(12), 7255-7263. doi: 10.4049/jimmunol.1100721
- Chauhan, V. S., Sterka, D. G., Jr., Gray, D. L., Bost, K. L., & Marriott, I. (2008). Neurogenic exacerbation of microglial and astrocyte responses to *Neisseria meningitidis* and *Borrelia burgdorferi*. *J Immunol*, 180(12), 8241-8249.
- Chen, K. H., Hsu, S. C., Chen, H. Y., Ng, K. F., & Chen, T. C. (2014). Utility of fluorescence in situ hybridization for ploidy and p57 immunostaining in discriminating hydatidiform moles. *Biochem Biophys Res Commun*, 446(2), 555-560. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.03.003

- Cheng, J. Q., Altomare, D. A., Klein, M. A., Lee, W. C., Kruh, G. D., Lissy, N. A., & Testa, J. R. (1997). Transforming activity and mitosis-related expression of the AKT2 oncogene: evidence suggesting a link between cell cycle regulation and oncogenesis. *Oncogene*, 14(23), 2793-2801. doi: 10.1038/sj.onc.1201121
- Cheung, A. N. (2003). Pathology of gestational trophoblastic diseases. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 17(6), 849-868.
- Cheung, A. N., Srivastava, G., Chung, L. P., Ngan, H. Y., Man, T. K., Liu, Y. T., . . . Ma, H. K. (1994). Expression of the p53 gene in trophoblastic cells in hydatidiform moles and normal human placentas. *J Reprod Med*, 39(3), 223-227.
- Chiwakata, C., Brackmann, B., Hunt, N., Davidoff, M., Schulze, W., & Ivell, R. (1991). Tachykinin (substance-P) gene expression in Leydig cells of the human and mouse testis. *Endocrinology*, 128(5), 2441-2448. doi: 10.1210/endo-128-5-2441
- Chizh, B. A., Gohring, M., Troster, A., Quartey, G. K., Schmelz, M., & Koppert, W. (2007). Effects of oral pregabalin and aprepitant on pain and central sensitization in the electrical hyperalgesia model in human volunteers. *Br J Anaesth*, 98(2), 246-254. doi: 10.1093/bja/ael344
- Citri, A., & Yarden, Y. (2006). EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(7), 505-516. doi: 10.1038/nrm1962
- Clark, D. E., Smith, S. K., He, Y., Day, K. A., Licence, D. R., Corps, A. N., . . . Charnock-Jones, D. S. (1998). A vascular endothelial growth factor antagonist is produced by the human placenta and released into the maternal circulation. *Biol Reprod*, 59(6), 1540-1548.
- Cole, L. A. (2009). New discoveries on the biology and detection of human chorionic gonadotropin. *Reprod Biol Endocrinol*, 7, 8. doi: 10.1186/1477-7827-7-8
- Cole, L. A., Butler, S. A., Khanlian, S. A., Giddings, A., Muller, C. Y., Seckl, M. J., & Kohorn, E. I. (2006). Gestational trophoblastic diseases: 2. Hyperglycosylated hCG as a reliable marker of active neoplasia. *Gynecol Oncol*, 102(2), 151-159. doi: 10.1016/j.ygyno.2005.12.045
- Committee, F. O. (2002). FIGO staging for gestational trophoblastic neoplasia 2000: FIGO Oncology Committee. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 77(3), 285-287. doi: http://dx.doi.org/10.1016/S0020-7292(02)00063-2
- Cottrell, G. S., Padilla, B., Pikios, S., Roosterman, D., Steinhoff, M., Gehringer, D., . . . Bunnett, N. W. (2006). Ubiquitin-dependent down-regulation of the neurokinin-1 receptor. *J Biol Chem*, 281(38), 27773-27783. doi: 10.1074/jbc.M603369200
- Cottrell, G. S., Padilla, B. E., Amadesi, S., Poole, D. P., Murphy, J. E., Hardt, M., . . . Bunnett, N. W. (2009). Endosomal endothelin-converting enzyme-1: a regulator of beta-arrestin-dependent ERK signaling. *J Biol Chem*, 284(33), 22411-22425. doi: 10.1074/jbc.M109.026674
- Council for International Organizations of Medical, S. (2002). International ethical guidelines for biomedical research involving human subjects. *Bull Med Ethics*(182), 17-23.
- Cronier, L., Alsat, E., Hervé, J.-C., Délèze, J., Malassiné, A., Moses, E. K., . . . Rice, G. E. (1998). Dexamethasone stimulates gap junctional communication, peptide hormone production and differentiation of human term trophoblast. *Trophoblast reserch*, 11, 35-49.

- Cronier, L., Guibourdenche, J., Niger, C., & Malassine, A. (1999). Oestradiol stimulates morphological and functional differentiation of human villous cytotrophoblast. *Placenta*, 20(8), 669-676. doi: 10.1053/plac.1999.0423
- Cui, Q. L., Yung, W. H., & Chen, L. (2008). Effects of substance P on neuronal firing of pallidal neurons in parkinsonian rats. *Neurosci Res*, 60(2), 162-169. doi: 10.1016/j.neures.2007.10.007
- D'Anna, R., Baviera, G., Corrado, F., Crisafulli, A., Ientile, R., Buemi, M., & Squadrito, F. (2004). Neurokinin B and nitric oxide plasma levels in pre-eclampsia and isolated intrauterine growth restriction. *BJOG*, 111(10), 1046-1050. doi: 10.1111/j.1471-0528.2004.00257.x
- Dakour, J., Li, H., Chen, H., & Morrish, D. W. (1999). EGF promotes development of a differentiated trophoblast phenotype having c-myc and junB proto-oncogene activation. *Placenta*, 20(1), 119-126. doi: 10.1053/plac.1998.0336
- Dale, H. (1935). Pharmacology and Nerve-endings (Walter Ernest Dixon Memorial Lecture): (Section of Therapeutics and Pharmacology). *Proc R Soc Med*, 28(3), 319-332.
- Dale, H. H. (1914). The action of certain esters and ethers of choline and their relation to muscarine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 6, 147-190.
- Dale, H. H., Dudley, H.W. . (1929). The presence of histamine and acetylcholine in the spleen of the ox and horse. *J. Physiol.*, 68, 97-123.
- Darby, S., Jolley, I., Pennington, S., & Hancock, B. W. (2009). Does chest CT matter in the staging of GTN? *Gynecol Oncol*, 112(1), 155-160. doi: 10.1016/j.ygyno.2008.10.003
- Davis, R. J. (1993). The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem*, 268(20), 14553-14556.
- De Felipe, C., Herrero, J. F., O'Brien, J. A., Palmer, J. A., Doyle, C. A., Smith, A. J., . . . Hunt, S. P. (1998). Altered nociception, analgesia and aggression in mice lacking the receptor for substance P. *Nature*, 392(6674), 394-397. doi: 10.1038/32904
- De Felipe, J. (2005). Cajal y sus dibujos: ciencia y arte *Arte y neurología* (pp. 213-230). Madrid: Saned.
- De la Vega, C. (1564). Liber de Arte Medendi. In I. Y. a. Lequerica (Ed.). Lyon.
- Debeljuk, L. (2006). Tachykinins and ovarian function in mammals. *Peptides*, 27(4), 736-742. doi: 10.1016/j.peptides.2005.08.002
- DeFea, K. A., Vaughn, Z. D., O'Bryan, E. M., Nishijima, D., Dery, O., & Bunnett, N. W. (2000). The proliferative and antiapoptotic effects of substance P are facilitated by formation of a beta-arrestin-dependent scaffolding complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(20), 11086-11091. doi: 10.1073/pnas.190276697
- DeFea, K. A., Zalevsky, J., Thoma, M. S., Dery, O., Mullins, R. D., & Bunnett, N. W. (2000). beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *J Cell Biol*, 148(6), 1267-1281.
- Defermon. (1827). Bulletin des Sciences Médicales (Vol. 12). Paris: Dufour et D'Ocagne & Treuttel et Würtz.
- Deicas, R. E., Miller, D. S., Rademaker, A. W., & Lurain, J. R. (1991). The role of contraception in the development of postmolar gestational trophoblastic tumor. *Obstet Gynecol*, 78(2), 221-226.

- Deiteren, A., De Winter, B. Y., Nullens, S., Pelckmans, P. A., & De Man, J. G. (2011). Role of tachykinin receptors in the modulation of colonic peristaltic activity in mice. *Eur J Pharmacol*, 667(1-3), 339-347. doi: 10.1016/j.ejphar.2011.05.044
- Delgado, A. V., McManus, A. T., & Chambers, J. P. (2005). Exogenous administration of Substance P enhances wound healing in a novel skin-injury model. *Exp Biol Med (Maywood)*, 230(4), 271-280.
- Della Rocca, G. J., van Biesen, T., Daaka, Y., Luttrell, D. K., Luttrell, L. M., & Lefkowitz, R. J. (1997). Ras-dependent mitogen-activated protein kinase activation by G protein-coupled receptors. Convergence of Gi- and Gq-mediated pathways on calcium/calmodulin, Pyk2, and Src kinase. *J Biol Chem*, 272(31), 19125-19132.
- Demir, R., & Erben, T. (1984). Some new findings about Hofbauer cells in the chorionic villi of the human placenta. *Acta Anat (Basel)*, 119(1), 18-26.
- Demir, R., Kaufmann, P., Castellucci, M., Erben, T., & Kotowski, A. (1989). Fetal vasculogenesis and angiogenesis in human placental villi. *Acta Anat (Basel)*, 136(3), 190-203.
- Demir, R., Kosanke, G., Kohnen, G., Kertschanska, S., & Kaufmann, P. (1997). Classification of human placental stem villi: review of structural and functional aspects. *Microsc Res Tech*, 38(1-2), 29-41. doi: 10.1002/(SICI)1097-0029(19970701/15)38:1/2<29::AID-JEMT5>3.0.CO;2-P
- Dempsey, E. W. (1972). The development of capillaries in the villi of early human placentas. *Am J Anat*, 134(2), 221-237. doi: 10.1002/aja.1001340207
- DeVane, C. L. (2001). Substance P: a new era, a new role. *Pharmacotherapy*, 21(9), 1061-1069.
- Dobrescu, G. (1998). [Intercellular communication]. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*, 102(3-4), 17-24.
- Dong, J., Feng, F., Xu, G., Zhang, H., Hong, L., & Yang, J. (2015). Elevated SP/NK-1R in esophageal carcinoma promotes esophageal carcinoma cell proliferation and migration. *Gene*, 560(2), 205-210. doi: 10.1016/j.gene.2015.02.002
- Douglas, S. D., Cnaan, A., Lynch, K. G., Benton, T., Zhao, H., Gettes, D. R., & Evans, D. L. (2008). Elevated substance P levels in HIV-infected women in comparison to HIV-negative women. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 24(3), 375-378. doi: 10.1089/aid.2007.0207
- Douglas, S. D., Ho, W. Z., Gettes, D. R., Cnaan, A., Zhao, H., Leserman, J., . . . Evans, D. L. (2001). Elevated substance P levels in HIV-infected men. *AIDS*, 15(15), 2043-2045.
- Dunzendorfer, S., Meierhofer, C., & Wiedermann, C. J. (1998). Signaling in neuropeptide-induced migration of human eosinophils. *J Leukoc Biol*, 64(6), 828-834.
- Eccles, J. C. (1986). Chemical transmission and Dale's principle. *Prog Brain Res*, 68, 3-13.
- El-Salhy, M., & Starefeldt, A. (2003). Direct effects of octreotide, galanin and serotonin on human colon cancer cells. *Oncol Rep*, 10(6), 1723-1728.
- Elliott, T. R. (1904). On the action of adrenaline. *J Physiol*, 31, 30-31.
- Enders, A. C. (2007). Implantation in the macaque: expansion of the implantation site during the first week of implantation. *Placenta*, 28(8-9), 794-802. doi: 10.1016/j.placenta.2006.11.001
- Ernst, O. P., & Bartl, F. J. (2002). Active states of rhodopsin. *ChemBiochem*, 3(10), 968-974. doi: 10.1002/1439-7633(20021004)3:10<968::AID-CBIC968>3.0.CO;2-Q
- Ersparmer, V. (1981). The tachykinin peptide family. *Trends in Neurosciences*, 4, 267-269.

- Espinoza, J., Uckele, J. E., Starr, R. A., Lorenz, R. P., Bronsteen, R. A., & Berry, S. M. (2009). Insights into angiogenic imbalances during pregnancy. *Obstet Gynecol*, 114(2 Pt 2), 437-440. doi: 10.1097/AOG.0b013e3181998877
- Esteban, F., Gonzalez-Moles, M. A., Castro, D., Martin-Jaen Mdel, M., Redondo, M., Ruiz-Avila, I., & Munoz, M. (2009). Expression of substance P and neurokinin-1-receptor in laryngeal cancer: linking chronic inflammation to cancer promotion and progression. *Histopathology*, 54(2), 258-260. doi: 10.1111/j.1365-2559.2008.03193.x
- Evans, T. W., Dixon, C. M., Clarke, B., Conradson, T. B., & Barnes, P. J. (1988). Comparison of neurokinin A and substance P on cardiovascular and airway function in man. *Br J Clin Pharmacol*, 25(2), 273-275.
- Exadaktylos, A. K., Buggy, D. J., Moriarty, D. C., Mascha, E., & Sessler, D. I. (2006). Can anesthetic technique for primary breast cancer surgery affect recurrence or metastasis? *Anesthesiology*, 105(4), 660-664.
- Fackler, O. T., & Grosse, R. (2008). Cell motility through plasma membrane blebbing. *J Cell Biol*, 181(6), 879-884. doi: 10.1083/jcb.200802081
- Farley, A. E., Graham, C. H., & Smith, G. N. (2004). Contractile properties of human placental anchoring villi. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 287(3), R680-685. doi: 10.1152/ajpregu.00222.2004
- Feistritzer, C., Clausen, J., Sturn, D. H., Djanani, A., Gunsilius, E., Wiedermann, C. J., & Kahler, C. M. (2003). Natural killer cell functions mediated by the neuropeptide substance P. *Regul Pept*, 116(1-3), 119-126.
- Feneley, M. R., & Burton, G. J. (1991). Villous composition and membrane thickness in the human placenta at term: a stereological study using unbiased estimators and optimal fixation techniques. *Placenta*, 12(2), 131-142.
- Ferrante, R. J., Kowall, N. W., Richardson, E. P., Jr., Bird, E. D., & Martin, J. B. (1986). Topography of enkephalin, substance P and acetylcholinesterase staining in Huntington's disease striatum. *Neurosci Lett*, 71(3), 283-288.
- Fest, S., Zenclussen, A. C., Joachim, R., Hagen, E., Demuth, H. U., & Hoffmann, T. (2006). Stress and substance P but not the substance P-metabolite SP5-11 trigger murine abortion by augmenting TNF-alpha levels at the feto-maternal interface. *Scand J Immunol*, 63(1), 42-49. doi: 10.1111/j.1365-3083.2005.001711.x
- Figini, M., Emanuelli, C., Bertrand, C., Sicuteri, R., Regoli, D., & Geppetti, P. (1997). Differential activation of the epithelial and smooth muscle NK1 receptors by synthetic tachykinin agonists in guinea-pig trachea. *Br J Pharmacol*, 121(4), 773-781. doi: 10.1038/sj.bjp.0701188
- Fisher, R. A., Hodges, M. D., & Newlands, E. S. (2004). Familial recurrent hydatidiform mole: a review. *J Reprod Med*, 49(8), 595-601.
- Flusberg, D. A., Numaguchi, Y., & Ingber, D. E. (2001). Cooperative control of Akt phosphorylation, bcl-2 expression, and apoptosis by cytoskeletal microfilaments and microtubules in capillary endothelial cells. *Mol Biol Cell*, 12(10), 3087-3094.
- Fock, V., Plessl, K., Fuchs, R., Dekan, S., Milla, S. K., Haider, S., . . . Pollheimer, J. (2015). Trophoblast subtype-specific EGFR/ERBB4 expression correlates with cell cycle progression and hyperplasia in complete hydatidiform moles. *Hum Reprod*, 30(4), 789-799. doi: 10.1093/humrep/dev027

- Folkers, K., Feng, D. M., Asano, N., Hakanson, R., Weisenfeld-Hallin, Z., & Leander, S. (1990). Spantide II, an effective tachykinin antagonist having high potency and negligible neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(12), 4833-4835.
- Folkers, K., Hakanson, R., Horig, J., Xu, J. C., & Leander, S. (1984). Biological evaluation of substance P antagonists. *Br J Pharmacol*, 83(2), 449-456.
- Fong, T. M., Anderson, S. A., Yu, H., Huang, R. R., & Strader, C. D. (1992). Differential activation of intracellular effector by two isoforms of human neurokinin-1 receptor. *Mol Pharmacol*, 41(1), 24-30.
- Fowler, D. J., Lindsay, I., Seckl, M. J., & Sebire, N. J. (2006). Routine pre-evacuation ultrasound diagnosis of hydatidiform mole: experience of more than 1000 cases from a regional referral center. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 27(1), 56-60. doi: 10.1002/uog.2592
- Fowler, D. J., Lindsay, I., Seckl, M. J., & Sebire, N. J. (2007). Histomorphometric features of hydatidiform moles in early pregnancy: relationship to detectability by ultrasound examination. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 29(1), 76-80. doi: 10.1002/uog.3880
- Fox, S. B., & Khong, T. Y. (1990). Lack of innervation of human umbilical cord. An immunohistological and histochemical study. *Placenta*, 11(1), 59-62.
- Friess, H., Zhu, Z., Liard, V., Shi, X., Shrikhande, S. V., Wang, L., . . . Buchler, M. W. (2003). Neurokinin-1 receptor expression and its potential effects on tumor growth in human pancreatic cancer. *Lab Invest*, 83(5), 731-742.
- Fu, J., Fang, F., Xie, L., Chen, H., He, F., Wu, T., . . . Lawrie, T. A. (2012). Prophylactic chemotherapy for hydatidiform mole to prevent gestational trophoblastic neoplasia. *Cochrane Database Syst Rev*, 10, CD007289. doi: 10.1002/14651858.CD007289.pub2
- Fujii, T., Murai, M., Morimoto, H., Maeda, Y., Yamaoka, M., Hagiwara, D., . . . Matsuo, M. (1992). Pharmacological profile of a high affinity dipeptide NK1 receptor antagonist, FK888. *Br J Pharmacol*, 107(3), 785-789.
- Fulop, V., Colitti, C. V., Genest, D., Berkowitz, R. S., Yiu, G. K., Ng, S. W., . . . Mok, S. C. (1998). DOC-2/hDab2, a candidate tumor suppressor gene involved in the development of gestational trophoblastic diseases. *Oncogene*, 17(4), 419-424. doi: 10.1038/sj.onc.1201955
- Fulop, V., Mok, S. C., & Berkowitz, R. S. (2004). Molecular biology of gestational trophoblastic neoplasia: a review. *J Reprod Med*, 49(6), 415-422.
- Fulop, V., Mok, S. C., Gati, I., & Berkowitz, R. S. (2002). Recent advances in molecular biology of gestational trophoblastic diseases. A review. *J Reprod Med*, 47(5), 369-379.
- Fulop, V., Mok, S. C., Genest, D. R., Gati, I., Doszpod, J., & Berkowitz, R. S. (1998). p53, p21, Rb and mdm2 oncoproteins. Expression in normal placenta, partial and complete mole, and choriocarcinoma. *J Reprod Med*, 43(2), 119-127.
- Fulop, V., Mok, S. C., Genest, D. R., Szigetvari, I., Cseh, I., & Berkowitz, R. S. (1998). c-myc, c-erbB-2, c-fms and bcl-2 oncoproteins. Expression in normal placenta, partial and complete mole, and choriocarcinoma. *J Reprod Med*, 43(2), 101-110.
- Fuxe, K., Li, X. M., Bjelke, B., Hedlund, P. B., Biagini, G., & Agnati, L. F. (1994). Possible mechanisms for the powerful actions of neuropeptides. *Ann N Y Acad Sci*, 739, 42-59.

- Gadea, G., de Toledo, M., Anguille, C., & Roux, P. (2007). Loss of p53 promotes RhoA-ROCK-dependent cell migration and invasion in 3D matrices. *J Cell Biol*, 178(1), 23-30. doi: 10.1083/jcb.200701120
- Gai, W. P., Halliday, G. M., Blumbergs, P. C., Geffen, L. B., & Blessing, W. W. (1991). Substance P-containing neurons in the mesopontine tegmentum are severely affected in Parkinson's disease. *Brain*, 114 (Pt 5), 2253-2267.
- Gale, N. W., & Yancopoulos, G. D. (1999). Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development. *Genes Dev*, 13(9), 1055-1066.
- Gamboa-Dominguez, A., Dominguez-Fonseca, C., Quintanilla-Martinez, L., Reyes-Gutierrez, E., Green, D., Angeles-Angeles, A., . . . Luber, B. (2004). Epidermal growth factor receptor expression correlates with poor survival in gastric adenocarcinoma from Mexican patients: a multivariate analysis using a standardized immunohistochemical detection system. *Mod Pathol*, 17(5), 579-587. doi: 10.1038/modpathol.3800085
- García, A. (2009). Diferenciación sexual y teorías reproductivas en época clásica. *Baética: Estudios de arte, geografía e historia*, 31, 207-228.
- Garcia-Lloret, M. I., Morrish, D. W., Wegmann, T. G., Honore, L., Turner, A. R., & Guilbert, L. J. (1994). Demonstration of functional cytokine-placental interactions: CSF-1 and GM-CSF stimulate human cytotrophoblast differentiation and peptide hormone secretion. *Exp Cell Res*, 214(1), 46-54. doi: 10.1006/excr.1994.1232
- Garcia-Lopez, M. J., Martinez-Martos, J. M., Mayas, M. D., Carrera, M. P., & Ramirez-Exposito, M. J. (2002). [Physiology of the neuropeptides]. *Rev Neurol*, 35(8), 784-793.
- Garland, A. M., Grady, E. F., Payan, D. G., Vigna, S. R., & Bunnett, N. W. (1994). Agonist-induced internalization of the substance P (NK1) receptor expressed in epithelial cells. *Biochem J*, 303 (Pt 1), 177-186.
- Genest, D. R., Berkowitz, R. S., Fisher, R. A., Newlands, E. S., & Feh, M. (2003). Gestational trophoblastic disease. In F. A. T. a. P. Devilee (Ed.), *Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs* (pp. 432). Lyon.
- Genest, D. R., Laborde, O., Berkowitz, R. S., Goldstein, D. P., Bernstein, M. R., & Lage, J. (1991). A clinicopathologic study of 153 cases of complete hydatidiform mole (1980-1990): histologic grade lacks prognostic significance. *Obstet Gynecol*, 78(3 Pt 1), 402-409.
- George, D. T., Gilman, J., Hersh, J., Thorsell, A., Herion, D., Geyer, C., . . . Heilig, M. (2008). Neurokinin 1 receptor antagonism as a possible therapy for alcoholism. *Science*, 319(5869), 1536-1539. doi: 10.1126/science.1153813
- Gerard, N. P., Garraway, L. A., Eddy, R. L., Jr., Shows, T. B., Iijima, H., Paquet, J. L., & Gerard, C. (1991). Human substance P receptor (NK-1): organization of the gene, chromosome localization, and functional expression of cDNA clones. *Biochemistry*, 30(44), 10640-10646.
- Gilkes, D. M., Pan, Y., Coppola, D., Yeatman, T., Reuther, G. W., & Chen, J. (2008). Regulation of MDMX expression by mitogenic signaling. *Mol Cell Biol*, 28(6), 1999-2010. doi: 10.1128/MCB.01633-07
- Gillberg, P. G., Aquilonius, S. M., Eckernas, S. A., Lundqvist, G., & Winblad, B. (1982). Choline acetyltransferase and substance P-like immuno-reactivity in the human spinal cord: changes in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res*, 250(2), 394-397.

- Gillespie, E., Leeman, S. E., Watts, L. A., Coukos, J. A., O'Brien, M. J., Cerda, S. R., . . . Becker, J. M. (2011). Truncated neurokinin-1 receptor is increased in colonic epithelial cells from patients with colitis-associated cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(42), 17420-17425. doi: 10.1073/pnas.1114275108
- Goel, H. L., & Mercurio, A. M. (2013). VEGF targets the tumour cell. *Nat Rev Cancer*, 13(12), 871-882. doi: 10.1038/nrc3627
- Gonzalez Moles, M. A., Esteban, F., Ruiz-Avila, I., Gil Montoya, J. A., Brener, S., Bascones-Martinez, A., & Munoz, M. (2009). A role for the substance P/NK-1 receptor complex in cell proliferation and apoptosis in oral lichen planus. *Oral Dis*, 15(2), 162-169. doi: 10.1111/j.1601-0825.2008.01504.x
- Gonzalez Moles, M. A., Mosqueda-Taylor, A., Esteban, F., Gil-Montoya, J. A., Diaz-Franco, M. A., Delgado, M., & Munoz, M. (2008). Cell proliferation associated with actions of the substance P/NK-1 receptor complex in keratocystic odontogenic tumours. *Oral Oncol*, 44(12), 1127-1133. doi: 10.1016/j.oraloncology.2008.02.010
- Goode, T., O'Connell, J., Ho, W. Z., O'Sullivan, G. C., Collins, J. K., Douglas, S. D., & Shanahan, F. (2000). Differential expression of neurokinin-1 receptor by human mucosal and peripheral lymphoid cells. *Clin Diagn Lab Immunol*, 7(3), 371-376.
- Grady, E. F., Garland, A. M., Gamp, P. D., Lovett, M., Payan, D. G., & Bunnett, N. W. (1995). Delineation of the endocytic pathway of substance P and its seven-transmembrane domain NK1 receptor. *Mol Biol Cell*, 6(5), 509-524.
- Graf, A. H., Hutter, W., Hacker, G. W., Steiner, H., Anderson, V., Staudach, A., & Dietze, O. (1996). Localization and distribution of vasoactive neuropeptides in the human placenta. *Placenta*, 17(7), 413-421.
- Grant, A. D., Akhtar, R., Gerard, N. P., & Brain, S. D. (2002). Neurokinin B induces oedema formation in mouse lung via tachykinin receptor-independent mechanisms. *J Physiol*, 543(Pt 3), 1007-1014.
- Guha, S., Eibl, G., Kisfalvi, K., Fan, R. S., Burdick, M., Reber, H., . . . Rozengurt, E. (2005). Broad-spectrum G protein-coupled receptor antagonist, [D-Arg1,D-Trp5,7,9,Leu11]SP: a dual inhibitor of growth and angiogenesis in pancreatic cancer. *Cancer Res*, 65(7), 2738-2745. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3197
- Guiard, B. P., Przybylski, C., Guilloux, J. P., Seif, I., Froger, N., De Felipe, C., . . . Gardier, A. M. (2004). Blockade of substance P (neurokinin 1) receptors enhances extracellular serotonin when combined with a selective serotonin reuptake inhibitor: an in vivo microdialysis study in mice. *J Neurochem*, 89(1), 54-63. doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.02304.x
- Guijarro, J. (1997). Evolución histórica de los conocimientos sobre la mola hidatidiforme. *Medicina Balear*, 12, 171-177.
- Hall, J. E. (2011). *Guyton y Hall. Tratado de fisiología médica*: Elsevier Health Sciences.
- Hamilton, W. J., & Boyd, J. D. (1960). Development of the human placenta in the first three months of gestation. *J Anat*, 94, 297-328.
- Hansen, V., Maigaard, S., Allen, J., & Forman, A. (1988). Effects of vasoactive intestinal polypeptide and substance P on human intramyometrial arteries and stem villous arteries in term pregnancy. *Placenta*, 9(5), 501-506.
- Harrowe, G., Mitsuhashi, M., & Payan, D. G. (1990). Measles virus-substance P receptor interactions. Possible novel mechanism of viral fusion. *J Clin Invest*, 85(4), 1324-1327. doi: 10.1172/JCI114571

- Hart, R. P., Shadiack, A. M., & Jonakait, G. M. (1991). Substance P gene expression is regulated by interleukin-1 in cultured sympathetic ganglia. *J Neurosci Res*, 29(3), 282-291. doi: 10.1002/jnr.490290303
- Harvey, J. M., Clark, G. M., Osborne, C. K., & Allred, D. C. (1999). Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol*, 17(5), 1474-1481.
- Hashimoto, M., Hayashi, K., Murai, M., Fujii, T., Nishikawa, M., Kiyoto, S., . . . Imanaka, H. (1992). WS9326A, a novel tachykinin antagonist isolated from *Streptomyces violaceusniger* no. 9326. II. Biological and pharmacological properties of WS9326A and tetrahydro-WS9326A (FK224). *J Antibiot (Tokyo)*, 45(7), 1064-1070.
- Hashimoto, T., Yamakawa, M., Kimura, S., Usuba, O., & Toyono, M. (2013). Expression of acetylated and dimethylated histone H3 in colorectal cancer. *Dig Surg*, 30(3), 249-258. doi: 10.1159/000351444
- Hastrup, H., & Schwartz, T. W. (1996). Septide and neurokinin A are high-affinity ligands on the NK-1 receptor: evidence from homologous versus heterologous binding analysis. *FEBS Lett*, 399(3), 264-266.
- Hay, D. W., Giardina, G. A., Griswold, D. E., Underwood, D. C., Kotzer, C. J., Bush, B., . . . Sarau, H. M. (2002). Nonpeptide tachykinin receptor antagonists. III. SB 235375, a low central nervous system-penetrant, potent and selective neurokinin-3 receptor antagonist, inhibits citric acid-induced cough and airways hyper-reactivity in guinea pigs. *J Pharmacol Exp Ther*, 300(1), 314-323.
- He, J., Xu, Q., Jing, Y., Agani, F., Qian, X., Carpenter, R., . . . Jiang, B. H. (2012). Reactive oxygen species regulate ERBB2 and ERBB3 expression via miR-199a/125b and DNA methylation. *EMBO Rep*, 13(12), 1116-1122. doi: 10.1038/embor.2012.162
- Heldin, C. H., & Westermark, B. (1990). Platelet-derived growth factor: mechanism of action and possible in vivo function. *Cell Regul*, 1(8), 555-566.
- Hempstock, J., Cindrova-Davies, T., Jauniaux, E., & Burton, G. J. (2004). Endometrial glands as a source of nutrients, growth factors and cytokines during the first trimester of human pregnancy: a morphological and immunohistochemical study. *Reprod Biol Endocrinol*, 2, 58. doi: 10.1186/1477-7827-2-58
- Henderson-Jackson, E. B., Helm, J., Strosberg, J., Nasir, N. A., Yeatman, T. J., Kvols, L. K., . . . Nasir, A. (2011). Palladin is a marker of liver metastasis in primary pancreatic endocrine carcinomas. *Anticancer Res*, 31(9), 2957-2962.
- Hennig, I. M., Laissue, J. A., Horisberger, U., & Reubi, J. C. (1995). Substance-P receptors in human primary neoplasms: tumoral and vascular localization. *Int J Cancer*, 61(6), 786-792.
- Hershey, A. D., Polenzani, L., Woodward, R. M., Miledi, R., & Krause, J. E. (1991). Molecular and genetic characterization, functional expression, and mRNA expression patterns of a rat substance P receptor. *Ann N Y Acad Sci*, 632, 63-78.
- Hertig, A. T., & Rock, J. (1949). Two human ova of the pre-villous stage, having a developmental age of about 8 and 9 days respectively. *Contrib Embryol*, 33(213-221), 169-186.
- Hertig, A. T., Rock, J., & Adams, E. C. (1956). A description of 34 human ova within the first 17 days of development. *Am J Anat*, 98(3), 435-493.
- Hesketh, P. J., Gralla, R. J., Webb, R. T., Ueno, W., DelPrete, S., Bachinsky, M. E., . . . Silberman, S. L. (1999). Randomized phase II study of the neurokinin 1 receptor

- antagonist CJ-11,974 in the control of cisplatin-induced emesis. *J Clin Oncol*, 17(1), 338-343.
- Heuser, C. H., & Streeter, G. L. (1941). Development of the macaque embryo. *Contrib Embryol*, 29, 15-55.
- Hibi, Y., Kambe, F., Imai, T., Ogawa, K., Shimizu, Y., Shibata, M., . . . Iwase, K. (2013). Increased protein kinase A type I α regulatory subunit expression in parathyroid gland adenomas of patients with primary hyperparathyroidism. *Endocr J*, 60(2), 215-223.
- Hipócrates. (1997). *Tratados hipocráticos 3: Sobre la dieta; Sobre las afecciones; Apéndice a Sobre la dieta en las enfermedades agudas; Sobre el uso de los líquidos; Sobre el alimento*. Madrid: Editorial Gredos.
- Ho, W. Z., Lai, J. P., Li, Y., & Douglas, S. D. (2002). HIV enhances substance P expression in human immune cells. *FASEB J*, 16(6), 616-618.
- Ho, W. Z., Lai, J. P., Zhu, X. H., Uvaydova, M., & Douglas, S. D. (1997). Human monocytes and macrophages express substance P and neurokinin-1 receptor. *J Immunol*, 159(11), 5654-5660.
- Hoesel, B., & Schmid, J. A. (2013). The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer*, 12, 86. doi: 10.1186/1476-4598-12-86
- Hoffmann, P., Hoeck, K., Deters, S., Werner-Martini, I., & Schmidt, W. E. (2010). Substance P and calcitonin gene related peptide induce TGF- α expression in epithelial cells via mast cells and fibroblasts. *Regul Pept*, 161(1-3), 33-37. doi: 10.1016/j.regpep.2009.12.016
- Hoffner, L., & Surti, U. (2012). The genetics of gestational trophoblastic disease: a rare complication of pregnancy. *Cancer Genet*, 205(3), 63-77. doi: 10.1016/j.cancergen.2012.01.004
- Hokfelt, T. (1991). Neuropeptides in perspective: the last ten years. *Neuron*, 7(6), 867-879.
- Hokfelt, T., Bartfai, T., & Bloom, F. (2003). Neuropeptides: opportunities for drug discovery. *Lancet Neurol*, 2(8), 463-472.
- Hokfelt, T., Broberger, C., Xu, Z. Q., Sergeev, V., Ubink, R., & Diez, M. (2000). Neuropeptides--an overview. *Neuropharmacology*, 39(8), 1337-1356.
- Hokfelt, T., Johansson, O., Ljungdahl, A., Lundberg, J. M., & Schultzberg, M. (1980). Peptidergic neurones. *Nature*, 284(5756), 515-521.
- Hokfelt, T., Lundberg, J. M., Schultzberg, M., Johansson, O., Ljungdahl, A., & Rehfeld, J. (1980). Coexistence of peptides and putative transmitters in neurons. *Adv Biochem Psychopharmacol*, 22, 1-23.
- Hokfelt, T., Pernow, B., & Wahren, J. (2001). Substance P: a pioneer amongst neuropeptides. *J Intern Med*, 249(1), 27-40.
- Hokfelt, T., Vincent, S., Dalsgaard, C. J., Skirboll, L., Johansson, O., Schultzberg, M., . . . Jancso, G. (1982). Distribution of substance P in brain and periphery and its possible role as a co-transmitter. *Ciba Found Symp*(91), 84-106.
- Holbro, T., Beerli, R. R., Maurer, F., Koziczak, M., Barbas, C. F., 3rd, & Hynes, N. E. (2003). The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(15), 8933-8938. doi: 10.1073/pnas.1537685100
- Holmgren, L., Flam, F., Larsson, E., & Ohlsson, R. (1993). Successive activation of the platelet-derived growth factor beta receptor and platelet-derived growth factor B

- genes correlates with the genesis of human choriocarcinoma. *Cancer Res*, 53(12), 2927-2931.
- Hong, H. S., Kim, S., Nam, S., Um, J., Kim, Y. H., & Son, Y. (2015). Effect of substance P on recovery from laser-induced retinal degeneration. *Wound Repair Regen*, 23(2), 268-277. doi: 10.1111/wrr.12264
- Hou, J. L., Wan, X. R., Xiang, Y., Qi, Q. W., & Yang, X. Y. (2008). Changes of clinical features in hydatidiform mole: analysis of 113 cases. *J Reprod Med*, 53(8), 629-633.
- Hoyer, D., & Bartfai, T. (2012). Neuropeptides and neuropeptide receptors: drug targets, and peptide and non-peptide ligands: a tribute to Prof. Dieter Seebach. *Chem Biodivers*, 9(11), 2367-2387. doi: 10.1002/cbdv.201200288
- Hsieh, F. J., Wu, C. C., Lee, C. N., Chen, T. M., Chen, C. A., Chen, F. C., . . . Hsieh, C. Y. (1994). Vascular patterns of gestational trophoblastic tumors by color Doppler ultrasound. *Cancer*, 74(8), 2361-2365.
- Huang, P. Q., Liu, L. X., Wei, B. G., & Ruan, Y. P. (2003). Asymmetric synthesis of (+)-L-733, 060 and (+)-CP-99, 994 based on a new chiral 3-piperidinol synthon. *Org Lett*, 5(11), 1927-1929. doi: 10.1021/ol034505g
- Huber, M. A., Azoitei, N., Baumann, B., Grunert, S., Sommer, A., Pehamberger, H., . . . Wirth, T. (2004). NF-kappaB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. *J Clin Invest*, 114(4), 569-581. doi: 10.1172/JCI21358
- Hui, P. (2011). *Gestational Trophoblastic Disease: Diagnostic and Molecular Genetic Pathology*: Humana Press.
- Huppertz, B., Frank, H. G., Kingdom, J. C., Reister, F., & Kaufmann, P. (1998). Villous cytotrophoblast regulation of the syncytial apoptotic cascade in the human placenta. *Histochem Cell Biol*, 110(5), 495-508.
- Huppertz, B., Kertschanska, S., Demir, A. Y., Frank, H. G., & Kaufmann, P. (1998). Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases (MMP), their substrates, and their inhibitors (TIMP) during trophoblast invasion in the human placenta. *Cell Tissue Res*, 291(1), 133-148.
- Hussein, M. R. (2009). Analysis of p53, BCL-2 and epidermal growth factor receptor protein expression in the partial and complete hydatidiform moles. *Exp Mol Pathol*, 87(1), 63-69. doi: 10.1016/j.yexmp.2009.03.005
- Imai, K., Minamiya, Y., Goto, A., Nanjo, H., Saito, H., Motoyama, S., . . . Ogawa, J. (2013). Bronchioloalveolar invasion in non-small cell lung cancer is associated with expression of transforming growth factor-beta1. *World J Surg Oncol*, 11, 113. doi: 10.1186/1477-7819-11-113
- Inoue, H., Shimoyama, Y., Hirabayashi, K., Kajigaya, H., Yamamoto, S., Oda, H., & Koshihara, Y. (2001). Production of neuropeptide substance P by synovial fibroblasts from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Neurosci Lett*, 303(3), 149-152.
- Inui, T., Saito, Y., Sakuma, H., Hatakeyama, H., Goto, Y., Arai, H., & Sasaki, M. (2012). Profiles of blood biomarkers in alternating hemiplegia of childhood--increased MMP-9 and decreased substance P indicates its pathophysiology. *Brain Dev*, 34(3), 196-200. doi: 10.1016/j.braindev.2011.04.008
- Jacob, J., & Balaram, P. (2012). Molecular alterations in epidermal growth factor receptors as potential predictors of invasion in complete hydatidiform moles (CHM). *Dis Markers*, 32(6), 371-381. doi: 10.3233/DMA-2012-0895

- Jancso, N., Jancso-Gabor, A., & Szolcsanyi, J. (1967). Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. *Br J Pharmacol Chemother*, 31(1), 138-151.
- Jiang, Y., Gao, G., Fang, G., Gustafson, E. L., Laverty, M., Yin, Y., . . . Murgolo, N. J. (2003). PepPat, a pattern-based oligopeptide homology search method and the identification of a novel tachykinin-like peptide. *Mamm Genome*, 14(5), 341-349. doi: 10.1007/s00335-002-3061-y
- Johns, J., Greenwold, N., Buckley, S., & Jauniaux, E. (2005). A prospective study of ultrasound screening for molar pregnancies in missed miscarriages. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 25(5), 493-497. doi: 10.1002/uog.1888
- Jones, E. G. (1994). The Neuron Doctrine 1891. *J Hist Neurosci*, 3(1), 3-20. doi: 10.1080/09647049409525584
- Joos, G. F., Germonpre, P. R., & Pauwels, R. A. (2000). Role of tachykinins in asthma. *Allergy*, 55(4), 321-337.
- Jorgensen, R., Holliday, N. D., Hansen, J. L., Vrecl, M., Heding, A., Schwartz, T. W., & Elling, C. E. (2008). Characterization of G-protein coupled receptor kinase interaction with the neurokinin-1 receptor using bioluminescence resonance energy transfer. *Mol Pharmacol*, 73(2), 349-358. doi: 10.1124/mol.107.038877
- Kage, R., Leeman, S. E., & Boyd, N. D. (1993). Biochemical characterization of two different forms of the substance P receptor in rat submaxillary gland. *J Neurochem*, 60(1), 347-351.
- Kage, R., McGregor, G. P., Thim, L., & Conlon, J. M. (1988). Neuropeptide-gamma: a peptide isolated from rabbit intestine that is derived from gamma-preprotachykinin. *J Neurochem*, 50(5), 1412-1417.
- Kahler, C. M., Herold, M., Reinisch, N., & Wiedermann, C. J. (1996). Interaction of substance P with epidermal growth factor and fibroblast growth factor in cyclooxygenase-dependent proliferation of human skin fibroblasts. *J Cell Physiol*, 166(3), 601-608. doi: 10.1002/(SICI)1097-4652(199603)166:3<601::AID-JCP15>3.0.CO;2-9
- Kajii, T., & Ohama, K. (1977). Androgenetic origin of hydatidiform mole. *Nature*, 268(5621), 633-634.
- Kang, B. N., Jeong, K. S., Park, S. J., Kim, S. J., Kim, T. H., Kim, H. J., & Ryu, S. Y. (2001). Regulation of apoptosis by somatostatin and substance P in peritoneal macrophages. *Regul Pept*, 101(1-3), 43-49.
- Kang, H. S., Trzaska, K. A., Corcoran, K., Chang, V. T., & Rameshwar, P. (2004). Neurokinin receptors: relevance to the emerging immune system. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 52(5), 338-347.
- Kangawa, K., Minamino, N., Fukuda, A., & Matsuo, H. (1983). Neuromedin K: a novel mammalian tachykinin identified in porcine spinal cord. *Biochem Biophys Res Commun*, 114(2), 533-540.
- Kant, V., Kumar, D., Kumar, D., Prasad, R., Gopal, A., Pathak, N. N., . . . Tandan, S. K. (2015). Topical application of substance P promotes wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cytokine*, 73(1), 144-155. doi: 10.1016/j.cyto.2014.12.015
- Kanter, D., Lindheimer, M. D., Wang, E., Borromeo, R. G., Bousfield, E., Karumanchi, S. A., & Stillman, I. E. (2010). Angiogenic dysfunction in molar pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 202(2), 184 e181-185. doi: 10.1016/j.ajog.2009.09.005

- Karagiannis, K., Stavropoulos, G., Poulos, C., Jordan, C. C., & Hagan, R. M. (1993). Synthesis of a potent antagonist of substance P by replacing the CH₂SCH₃ and the alpha-carboxamide groups of the methionine at [Orn⁶]-SP⁶-11 by benzyl ester groups. *Int J Pept Protein Res*, 42(6), 565-569.
- Karhunen, T., Vilim, F. S., Alexeeva, V., Weiss, K. R., & Church, P. J. (2001). Targeting of peptidergic vesicles in cotransmitting terminals. *J Neurosci*, 21(3), RC127.
- Karin, M. (2006). Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature*, 441(7092), 431-436. doi: 10.1038/nature04870
- Karin, M. (2009). NF-kappaB as a critical link between inflammation and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1(5), a000141. doi: 10.1101/cshperspect.a000141
- Kast, R. E. (2009). Why cerebellar glioblastoma is rare and how that indicates adjunctive use of the FDA-approved anti-emetic aprepitant might retard cerebral glioblastoma growth: a new hypothesis to an old question. *Clin Transl Oncol*, 11(7), 408-410.
- Katsanos, G. S., Anogeianaki, A., Orso, C., Tete, S., Salini, V., Antinolfi, P. L., & Sabatino, G. (2008). Mast cells and chemokines. *J Biol Regul Homeost Agents*, 22(3), 145-151.
- Kaufmann, P., Mayhew, T. M., & Charnock-Jones, D. S. (2004). Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. II. Changes during normal pregnancy. *Placenta*, 25(2-3), 114-126. doi: 10.1016/j.placenta.2003.10.009
- Kaufmann, P., Sen, D. K., & Schweikhart, G. (1979). Classification of human placental villi. I. Histology. *Cell Tissue Res*, 200(3), 409-423.
- Kaufmann, P., Stark, J., & Stegner, H. E. (1977). The villous stroma of the human placenta. I. The ultrastructure of fixed connective tissue cells. *Cell Tissue Res*, 177(1), 105-121.
- Kerdelhue, B., Lenoir, V., Scholler, R., & Jones, H. W., Jr. (2006). Substance P plasma concentration during the LH preovulatory surge of the menstrual cycle in the human. *Neuro Endocrinol Lett*, 27(3), 359-364.
- Khan, S., Katabuchi, H., Araki, M., Nishimura, R., & Okamura, H. (2000). Human villous macrophage-conditioned media enhance human trophoblast growth and differentiation in vitro. *Biol Reprod*, 62(4), 1075-1083.
- Kimura, S., Okada, M., Sugita, Y., Kanawaza, I., Munetake, E. . (1983). Novel Neuropeptides, Neurokinin α and β isolated from Porcine Spinal Cord. *Proc. Japan Acad.*, 59(4), 101-104.
- King, K. A., Hu, C., Rodriguez, M. M., Romaguera, R., Jiang, X., & Piedimonte, G. (2001). Exaggerated neurogenic inflammation and substance P receptor upregulation in RSV-infected weanling rats. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 24(2), 101-107. doi: 10.1165/ajrcmb.24.2.4264
- Koga, K., Osuga, Y., Tajima, T., Hirota, Y., Igarashi, T., Fujii, T., . . . Taketani, Y. (2010). Elevated serum soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) level in women with hydatidiform mole. *Fertil Steril*, 94(1), 305-308. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.02.015
- Koh, Y. H., Tamizhselvi, R., & Bhatia, M. (2010). Extracellular signal-regulated kinase 1/2 and c-Jun NH₂-terminal kinase, through nuclear factor-kappaB and activator protein-1, contribute to caerulein-induced expression of substance P and neurokinin-1 receptors in pancreatic acinar cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 332(3), 940-948. doi: 10.1124/jpet.109.160416

- Kohnen, G., Kertschanska, S., Demir, R., & Kaufmann, P. (1996). Placental villous stroma as a model system for myofibroblast differentiation. *Histochem Cell Biol*, 105(6), 415-429.
- Kowall, N. W., Quigley, B. J., Jr., Krause, J. E., Lu, F., Kosofsky, B. E., & Ferrante, R. J. (1993). Substance P and substance P receptor histochemistry in human neurodegenerative diseases. *Regul Pept*, 46(1-2), 174-185.
- Koyama, S., Sato, E., Nomura, H., Kubo, K., Nagai, S., & Izumi, T. (1998). Acetylcholine and substance P stimulate bronchial epithelial cells to release eosinophil chemotactic activity. *J Appl Physiol* (1985), 84(5), 1528-1534.
- Kramer, M. S., Cutler, N., Feighner, J., Shrivastava, R., Carman, J., Sramek, J. J., . . . Rupniak, N. M. (1998). Distinct mechanism for antidepressant activity by blockade of central substance P receptors. *Science*, 281(5383), 1640-1645.
- Krause, J. E., Takeda, Y., & Hershey, A. D. (1992). Structure, functions, and mechanisms of substance P receptor action. *J Invest Dermatol*, 98(6 Suppl), 2S-7S.
- Kucharczak, J., Simmons, M. J., Fan, Y., & Gelinas, C. (2003). To be, or not to be: NF-kappaB is the answer--role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis. *Oncogene*, 22(56), 8961-8982. doi: 10.1038/sj.onc.1207230
- Kurman, R. J., Ellenson, L. H., & Ronnett, B. M. (2012). *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract*: Springer US.
- Kurtz, M. M., Wang, R., Clements, M. K., Cascieri, M. A., Austin, C. P., Cunningham, B. R., . . . Liu, Q. (2002). Identification, localization and receptor characterization of novel mammalian substance P-like peptides. *Gene*, 296(1-2), 205-212.
- Lage, J. M., & Popek, E. J. (1993). The role of DNA flow cytometry in evaluation of partial and complete hydatidiform moles and hydropic abortions. *Semin Diagn Pathol*, 10(3), 267-274.
- Lai, J. P., Cnaan, A., Zhao, H., & Douglas, S. D. (2008). Detection of full-length and truncated neurokinin-1 receptor mRNA expression in human brain regions. *J Neurosci Methods*, 168(1), 127-133. doi: 10.1016/j.jneumeth.2007.10.004
- Lai, J. P., Ho, W. Z., Kilpatrick, L. E., Wang, X., Tuluc, F., Korchak, H. M., & Douglas, S. D. (2006). Full-length and truncated neurokinin-1 receptor expression and function during monocyte/macrophage differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(20), 7771-7776. doi: 10.1073/pnas.0602563103
- Lai, J. P., Lai, S., Tuluc, F., Tansky, M. F., Kilpatrick, L. E., Leeman, S. E., & Douglas, S. D. (2008). Differences in the length of the carboxyl terminus mediate functional properties of neurokinin-1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(34), 12605-12610. doi: 10.1073/pnas.0806632105
- Lai, X. N., Wang, Z. G., Wei, L., Zhu, J. M., & Wang, L. L. (2003). [Sensory neuropeptide SP modulating expression of EGF, FGF-2 and their receptors in fibroblasts of granulation in vivo and in vitro]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 83(16), 1433-1436.
- Laliberte, C., DiMarzo, L., Morrish, D. W., & Kaufman, S. (2004). Neurokinin B causes concentration-dependent relaxation of isolated human placental resistance vessels. *Regul Pept*, 117(2), 123-126.
- Lam, C., Lim, K. H., & Karumanchi, S. A. (2005). Circulating angiogenic factors in the pathogenesis and prediction of preeclampsia. *Hypertension*, 46(5), 1077-1085. doi: 10.1161/01.HYP.0000187899.34379.b0
- Lambrecht, B. N., Germonpre, P. R., Everaert, E. G., Carro-Muino, I., De Veerman, M., de Felipe, C., . . . Pauwels, R. A. (1999). Endogenously produced substance P

- contributes to lymphocyte proliferation induced by dendritic cells and direct TCR ligation. *Eur J Immunol*, 29(12), 3815-3825. doi: 10.1002/(SICI)1521-4141(199912)29:12<3815::AID-IMMU3815>3.0.CO;2-#
- Lang, K., Drell, T. L., Niggemann, B., Zanker, K. S., & Entschladen, F. (2003). Neurotransmitters regulate the migration and cytotoxicity in natural killer cells. *Immunol Lett*, 90(2-3), 165-172.
- Lang, K., Drell, T. L. t., Lindecke, A., Niggemann, B., Kaltschmidt, C., Zaenker, K. S., & Entschladen, F. (2004). Induction of a metastatogenic tumor cell type by neurotransmitters and its pharmacological inhibition by established drugs. *Int J Cancer*, 112(2), 231-238. doi: 10.1002/ijc.20410
- Langdon, S., Sethi, T., Ritchie, A., Muir, M., Smyth, J., & Rozengurt, E. (1992). Broad spectrum neuropeptide antagonists inhibit the growth of small cell lung cancer in vivo. *Cancer Res*, 52(16), 4554-4557.
- Lappano, R., & Maggiolini, M. (2011). G protein-coupled receptors: novel targets for drug discovery in cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 10(1), 47-60. doi: 10.1038/nrd3320
- Lasaga, M., & Debeljuk, L. (2011). Tachykinins and the hypothalamo-pituitary-gonadal axis: An update. *Peptides*, 32(9), 1972-1978. doi: 10.1016/j.peptides.2011.07.009
- Lavielle, S., Brunissen, A., Carruette, A., Garret, C., & Chassaing, G. (1994). Highly potent substance P antagonists substituted with beta-phenyl- or beta-benzyl-proline at position 10. *Eur J Pharmacol*, 258(3), 273-276.
- Lazure, C., Seidah, N. G., Pelaprat, D., & Chretien, M. (1983). Proteases and posttranslational processing of prohormones: a review. *Can J Biochem Cell Biol*, 61(7), 501-515.
- Leander, S., Hakanson, R., Rosell, S., Folkers, K., Sundler, F., & Tornqvist, K. (1981). A specific substance P antagonist blocks smooth muscle contractions induced by non-cholinergic, non-adrenergic nerve stimulation. *Nature*, 294(5840), 467-469.
- Lecat, S., Bucher, B., Mely, Y., & Galzi, J. L. (2002). Mutations in the extracellular amino-terminal domain of the NK2 neurokinin receptor abolish cAMP signaling but preserve intracellular calcium responses. *J Biol Chem*, 277(44), 42034-42048. doi: 10.1074/jbc.M203606200
- Lembeck, F., & Holzer, P. (1979). Substance P as neurogenic mediator of antidromic vasodilation and neurogenic plasma extravasation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 310(2), 175-183.
- Levine, R. J., Maynard, S. E., Qian, C., Lim, K. H., England, L. J., Yu, K. F., . . . Karumanchi, S. A. (2004). Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med*, 350(7), 672-683. doi: 10.1056/NEJMoa031884
- Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica. (2007). Boletín Oficial del Estado.
- Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica, . (2002). Boletín Oficial del Estado.
- Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal. (1999). Boletín Oficial del Estado.
- Li, H. W., Tsao, S. W., & Cheung, A. N. (2002). Current understandings of the molecular genetics of gestational trophoblastic diseases. *Placenta*, 23(1), 20-31. doi: 10.1053/plac.2001.0744

- Li, X., Ma, G., Ma, Q., Li, W., Liu, J., Han, L., . . . Wu, E. (2013). Neurotransmitter substance P mediates pancreatic cancer perineural invasion via NK-1R in cancer cells. *Mol Cancer Res*, 11(3), 294-302. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-12-0609
- Lighvani, S., Huang, X., Trivedi, P. P., Swanborg, R. H., & Hazlett, L. D. (2005). Substance P regulates natural killer cell interferon-gamma production and resistance to *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Eur J Immunol*, 35(5), 1567-1575. doi: 10.1002/eji.200425902
- Linnik, M. D., & Moskowitz, M. A. (1989). Identification of immunoreactive substance P in human and other mammalian endothelial cells. *Peptides*, 10(5), 957-962.
- Lisman, B. A., van den Hoff, M. J., Boer, K., Bleker, O. P., van Groningen, K., & Exalto, N. (2007). The architecture of first trimester chorionic villous vascularization: a confocal laser scanning microscopical study. *Hum Reprod*, 22(8), 2254-2260. doi: 10.1093/humrep/dem143
- Liu, J. Y., Hu, J. H., Zhu, Q. G., Li, F. Q., & Sun, H. J. (2006). Substance P receptor expression in human skin keratinocytes and fibroblasts. *Br J Dermatol*, 155(4), 657-662. doi: 10.1111/j.1365-2133.2006.07408.x
- Ljungdahl, A., Hokfelt, T., & Nilsson, G. (1978). Distribution of substance P-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat--I. Cell bodies and nerve terminals. *Neuroscience*, 3(10), 861-943.
- Loewi, O. (1921). Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. I.Mitteilung. *Pflügers Arch Ges Physiol*, 189, 239-242.
- López de Villalobos, F. (1498). Sumario de la Medicina con un tratado sobre las pestíferas buvas. In A. d. Barreda (Ed.). Salamanca.
- Lotz, M., Carson, D. A., & Vaughan, J. H. (1987). Substance P activation of rheumatoid synoviocytes: neural pathway in pathogenesis of arthritis. *Science*, 235(4791), 893-895.
- Lundberg, J. M. (1996). Pharmacology of cotransmission in the autonomic nervous system: integrative aspects on amines, neuropeptides, adenosine triphosphate, amino acids and nitric oxide. *Pharmacol Rev*, 48(1), 113-178.
- Lundberg, J. M., Martinsson, A., Hemsén, A., Theodorsson-Norheim, E., Svedénhag, J., Ekblom, B., & Hjendahl, P. (1985). Co-release of neuropeptide Y and catecholamines during physical exercise in man. *Biochem Biophys Res Commun*, 133(1), 30-36.
- Luo, W., Sharif, T. R., & Sharif, M. (1996). Substance P-induced mitogenesis in human astrocytoma cells correlates with activation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Cancer Res*, 56(21), 4983-4991.
- Lurain, J. R. (2010). Gestational trophoblastic disease I: epidemiology, pathology, clinical presentation and diagnosis of gestational trophoblastic disease, and management of hydatidiform mole. *Am J Obstet Gynecol*, 203(6), 531-539. doi: 10.1016/j.ajog.2010.06.073
- Lurain, J. R. (2011). Gestational trophoblastic disease II: classification and management of gestational trophoblastic neoplasia. *Am J Obstet Gynecol*, 204(1), 11-18. doi: 10.1016/j.ajog.2010.06.072
- Maggi, C. A. (1995). The mammalian tachykinin receptors. *Gen Pharmacol*, 26(5), 911-944.
- Maggi, C. A. (2000). Principles of tachykinergic co-transmission in the peripheral and enteric nervous system. *Regul Pept*, 93(1-3), 53-64.

- Maggi, C. A., & Meli, A. (1988). The sensory-efferent function of capsaicin-sensitive sensory neurons. *Gen Pharmacol*, 19(1), 1-43.
- Maggi, C. A., & Schwartz, T. W. (1997). The dual nature of the tachykinin NK1 receptor. *Trends Pharmacol Sci*, 18(10), 351-355.
- Maggiori, M. S., & Peres, L. C. (2007). Morphological, immunohistochemical and chromosome in situ hybridization in the differential diagnosis of Hydatidiform Mole and Hydropic Abortion. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 135(2), 170-176. doi: 10.1016/j.ejogrb.2007.05.005
- Maintz, L., Wardelmann, E., Walgenbach, K., Fimmers, R., Bieber, T., Raap, U., & Novak, N. (2011). Neuropeptide blood levels correlate with mast cell load in patients with mastocytosis. *Allergy*, 66(7), 862-869. doi: 10.1111/j.1398-9995.2011.02550.x
- Malbon, C. C. (2005). G proteins in development. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(9), 689-701. doi: 10.1038/nrm1716
- Maneuf, Y. P., Mitchell, I. J., Crossman, A. R., & Brotchie, J. M. (1994). On the role of enkephalin cotransmission in the GABAergic striatal efferents to the globus pallidus. *Exp Neurol*, 125(1), 65-71. doi: 10.1006/exnr.1994.1007
- Mangili, G., Lorusso, D., Brown, J., Pfisterer, J., Massuger, L., Vaughan, M., . . . Seckl, M. J. (2014). Trophoblastic disease review for diagnosis and management: a joint report from the International Society for the Study of Trophoblastic Disease, European Organisation for the Treatment of Trophoblastic Disease, and the Gynecologic Cancer InterGroup. *Int J Gynecol Cancer*, 24(9 Suppl 3), S109-116. doi: 10.1097/IGC.0000000000000294
- Mantelli, F., Micera, A., Sacchetti, M., & Bonini, S. (2010). Neurogenic inflammation of the ocular surface. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 10(5), 498-504. doi: 10.1097/ACI.0b013e32833e16cc
- Mantyh, P. W., Hunt, S. P., & Maggio, J. E. (1984). Substance P receptors: localization by light microscopic autoradiography in rat brain using [3H]SP as the radioligand. *Brain Res*, 307(1-2), 147-165.
- Mantyh, P. W., Rogers, S. D., Honore, P., Allen, B. J., Ghilardi, J. R., Li, J., . . . Simone, D. A. (1997). Inhibition of hyperalgesia by ablation of lamina I spinal neurons expressing the substance P receptor. *Science*, 278(5336), 275-279.
- Marcus, P. (2011). Gestational trophoblastic neoplasms: a century of progress. *The female patient*, 36, 35-40.
- Marzioni, D., Fiore, G., Giordano, A., Nabissi, M., Florio, P., Verdenelli, F., . . . Castellucci, M. (2005). Placental expression of substance P and vasoactive intestinal peptide: evidence for a local effect on hormone release. *J Clin Endocrinol Metab*, 90(4), 2378-2383. doi: 10.1210/jc.2004-1512
- Massi, M., Panocka, I., & de Caro, G. (2000). The psychopharmacology of tachykinin NK-3 receptors in laboratory animals. *Peptides*, 21(11), 1597-1609.
- Maynard, S. E., Min, J. Y., Merchan, J., Lim, K. H., Li, J., Mondal, S., . . . Karumanchi, S. A. (2003). Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest*, 111(5), 649-658. doi: 10.1172/JCI17189
- McConnell, T. G., Murphy, K. M., Hafez, M., Vang, R., & Ronnett, B. M. (2009). Diagnosis and subclassification of hydatidiform moles using p57 immunohistochemistry and molecular genotyping: validation and prospective analysis in routine and

- consultation practice settings with development of an algorithmic approach. *Am J Surg Pathol*, 33(6), 805-817. doi: 10.1097/PAS.0b013e318191f309
- McLean, S., Ganong, A., Seymour, P. A., Bryce, D. K., Crawford, R. T., Morrone, J., . . . Heym, J. (1996). Characterization of CP-122,721; a nonpeptide antagonist of the neurokinin NK1 receptor. *J Pharmacol Exp Ther*, 277(2), 900-908.
- Medrano, S., Gruenstein, E., & Dimlich, R. V. (1994). Substance P receptors on human astrocytoma cells are linked to glycogen breakdown. *Neurosci Lett*, 167(1-2), 14-18.
- Meini, S., Patacchini, R., & Maggi, C. A. (1994). Tachykinin NK1 receptor subtypes in the rat urinary bladder. *Br J Pharmacol*, 111(3), 739-746.
- Meshki, J., Douglas, S. D., Lai, J. P., Schwartz, L., Kilpatrick, L. E., & Tuluc, F. (2009). Neurokinin 1 receptor mediates membrane blebbing in HEK293 cells through a Rho/Rho-associated coiled-coil kinase-dependent mechanism. *J Biol Chem*, 284(14), 9280-9289. doi: 10.1074/jbc.M808825200
- Metwali, A., Blum, A. M., Elliott, D. E., Setiawan, T., & Weinstock, J. V. (2004). Cutting edge: hemokinin has substance P-like function and expression in inflammation. *J Immunol*, 172(11), 6528-6532.
- Milner, P., Kirkpatrick, K. A., Ralevic, V., Toothill, V., Pearson, J., & Burnstock, G. (1990). Endothelial cells cultured from human umbilical vein release ATP, substance P and acetylcholine in response to increased flow. *Proc Biol Sci*, 241(1302), 245-248. doi: 10.1098/rspb.1990.0092
- Minamino, N., Kangawa, K., Fukuda, A., & Matsuo, H. (1984). Neuromedin L: a novel mammalian tachykinin identified in porcine spinal cord. *Neuropeptides*, 4(2), 157-166.
- Mohan, A., Mallikarjuna, K., Venkatesan, N., Abhyankar, D., Parikh, P. M., & Krishnakumar, S. (2006). The study of c-Src kinase and pStat3 protein expression in retinoblastoma. *Exp Eye Res*, 83(4), 736-740. doi: 10.1016/j.exer.2006.02.011
- Moore, R. N., Osmand, A. P., Dunn, J. A., Joshi, J. G., & Rouse, B. T. (1988). Substance P augmentation of CSF-1-stimulated in vitro myelopoiesis. A two-signal progenitor restricted, tuftsin-like effect. *J Immunol*, 141(8), 2699-2703.
- Morteau, O., Lu, B., Gerard, C., & Gerard, N. P. (2001). Hemokinin 1 is a full agonist at the substance P receptor. *Nat Immunol*, 2(12), 1088. doi: 10.1038/ni1201-1088
- Mukerji, I., Ramkissoon, S. H., Reddy, K. K., & Rameshwar, P. (2005). Autocrine proliferation of neuroblastoma cells is partly mediated through neurokinin receptors: relevance to bone marrow metastasis. *J Neurooncol*, 71(2), 91-98. doi: 10.1007/s11060-004-9182-2
- Munoz, M., Berger, M., Rosso, M., Gonzalez-Ortega, A., Carranza, A., & Covenas, R. (2014). Antitumor activity of neurokinin-1 receptor antagonists in MG-63 human osteosarcoma xenografts. *Int J Oncol*, 44(1), 137-146. doi: 10.3892/ijo.2013.2164
- Munoz, M., Carranza, A., Pavon, A., Anderson, G., & Covenas, R. (2013). Immunolocalization of substance P and NK-1 receptor in Hofbauer cells in human normal placenta. *Microsc Res Tech*, 76(12), 1310-1313. doi: 10.1002/jemt.22303
- Munoz, M., & Covenas, R. (2013a). Involvement of substance P and the NK-1 receptor in cancer progression. *Peptides*, 48, 1-9. doi: 10.1016/j.peptides.2013.07.024
- Munoz, M., & Covenas, R. (2013b). Safety of neurokinin-1 receptor antagonists. *Expert Opin Drug Saf*, 12(5), 673-685. doi: 10.1517/14740338.2013.804059

- Munoz, M., & Covenas, R. (2014). Involvement of substance P and the NK-1 receptor in pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*, 20(9), 2321-2334. doi: 10.3748/wjg.v20.i9.2321
- Munoz, M., Covenas, R., Esteban, F., & Redondo, M. (2015). The substance P/NK-1 receptor system: NK-1 receptor antagonists as anti-cancer drugs. *J Biosci*, 40(2), 441-463.
- Munoz, M., Gonzalez-Ortega, A., & Covenas, R. (2012). The NK-1 receptor is expressed in human leukemia and is involved in the antitumor action of aprepitant and other NK-1 receptor antagonists on acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Invest New Drugs*, 30(2), 529-540. doi: 10.1007/s10637-010-9594-0
- Munoz, M., Gonzalez-Ortega, A., Rosso, M., Robles-Frias, M. J., Carranza, A., Salinas-Martin, M. V., & Covenas, R. (2012). The substance P/neurokinin-1 receptor system in lung cancer: focus on the antitumor action of neurokinin-1 receptor antagonists. *Peptides*, 38(2), 318-325. doi: 10.1016/j.peptides.2012.09.024
- Munoz, M., Gonzalez-Ortega, A., Salinas-Martin, M. V., Carranza, A., Garcia-Recio, S., Almendro, V., & Covenas, R. (2014). The neurokinin-1 receptor antagonist aprepitant is a promising candidate for the treatment of breast cancer. *Int J Oncol*, 45(4), 1658-1672. doi: 10.3892/ijo.2014.2565
- Munoz, M., Pavon, A., Rosso, M., Salinas, M. V., Perez, A., Carranza, A., & Gonzalez-Ortega, A. (2010). Immunolocalization of NK-1 receptor and Substance P in human normal placenta. *Placenta*, 31(7), 649-651. doi: 10.1016/j.placenta.2010.03.015
- Munoz, M., Perez, A., Covenas, R., Rosso, M., & Castro, E. (2004). Antitumoural action of L-733,060 on neuroblastoma and glioma cell lines. *Arch Ital Biol*, 142(2), 105-112.
- Munoz, M., Perez, A., Rosso, M., Zamarriego, C., & Rosso, R. (2004). Antitumoral action of the neurokinin-1 receptor antagonist L-733 060 on human melanoma cell lines. *Melanoma Res*, 14(3), 183-188.
- Munoz, M., & Rosso, M. (2010). The NK-1 receptor antagonist aprepitant as a broad spectrum antitumor drug. *Invest New Drugs*, 28(2), 187-193. doi: 10.1007/s10637-009-9218-8
- Munoz, M., Rosso, M., Aguilar, F. J., Gonzalez-Moles, M. A., Redondo, M., & Esteban, F. (2008). NK-1 receptor antagonists induce apoptosis and counteract substance P-related mitogenesis in human laryngeal cancer cell line HEp-2. *Invest New Drugs*, 26(2), 111-118. doi: 10.1007/s10637-007-9087-y
- Munoz, M., Rosso, M., Casinello, F., & Covenas, R. (2010). Paravertebral anesthesia: how substance P and the NK-1 receptor could be involved in regional block and breast cancer recurrence. *Breast Cancer Res Treat*, 122(2), 601-603. doi: 10.1007/s10549-010-0850-y
- Munoz, M., Rosso, M., & Covenas, R. (2010). A new frontier in the treatment of cancer: NK-1 receptor antagonists. *Curr Med Chem*, 17(6), 504-516.
- Munoz, M., Rosso, M., & Covenas, R. (2011). The NK-1 receptor: a new target in cancer therapy. *Curr Drug Targets*, 12(6), 909-921.
- Munoz, M., Rosso, M., Covenas, R., Montero, I., Gonzalez-Moles, M. A., & Robles, M. J. (2007). Neurokinin-1 receptors located in human retinoblastoma cell lines: antitumor action of its antagonist, L-732,138. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48(6), 2775-2781. doi: 10.1167/iovs.05-1591
- Munoz, M., Rosso, M., Perez, A., Covenas, R., Rosso, R., Zamarriego, C., & Piruat, J. I. (2005). The NK1 receptor is involved in the antitumoural action of L-733,060 and in

- the mitogenic action of substance P on neuroblastoma and glioma cell lines. *Neuropeptides*, 39(4), 427-432. doi: 10.1016/j.npep.2005.03.004
- Munoz, M., Rosso, M., Perez, A., Covenas, R., Rosso, R., Zamarriego, C., . . . Montero, I. (2005). Antitumoral action of the neurokinin-1-receptor antagonist L-733,060 and mitogenic action of substance P on human retinoblastoma cell lines. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46(7), 2567-2570. doi: 10.1167/iovs.04-1530
- Munoz, M., Rosso, M., Robles-Frias, M. J., Salinas-Martin, M. V., Rosso, R., Gonzalez-Ortega, A., & Covenas, R. (2010). The NK-1 receptor is expressed in human melanoma and is involved in the antitumor action of the NK-1 receptor antagonist aprepitant on melanoma cell lines. *Lab Invest*, 90(8), 1259-1269. doi: 10.1038/labinvest.2010.92
- Murphy, J. E., Roosterman, D., Cottrell, G. S., Padilla, B. E., Feld, M., Brand, E., . . . Steinhoff, M. (2011). Protein phosphatase 2A mediates resensitization of the neurokinin 1 receptor. *Am J Physiol Cell Physiol*, 301(4), C780-791. doi: 10.1152/ajpcell.00096.2011
- Murphy, K. M., McConnell, T. G., Hafez, M. J., Vang, R., & Ronnett, B. M. (2009). Molecular genotyping of hydatidiform moles: analytic validation of a multiplex short tandem repeat assay. *J Mol Diagn*, 11(6), 598-605. doi: 10.2353/jmoldx.2009.090039
- Mussap, C. J., Geraghty, D. P., & Burcher, E. (1993). Tachykinin receptors: a radioligand binding perspective. *J Neurochem*, 60(6), 1987-2009.
- Nagymanyoki, Z., Growdon, W. B., Sarno, J., Callahan, M. J., Parast, M. M., Fulop, V., . . . Berkowitz, R. S. (2008). Vascularization and expression of angiogenic factors in partial and complete molar pregnancies. *J Reprod Med*, 53(8), 589-594.
- Najafian, B., Shohrati, M., Harandi, A. A., Mahyar, S., Khareshi, I., & Ghanei, M. (2014). Serum level of substance P in patients with lung injuries due to sulfur mustard. *Adv Biomed Res*, 3, 137. doi: 10.4103/2277-9175.135154
- Nassini, R., Materazzi, S., De Siena, G., De Cesaris, F., & Geppetti, P. (2010). Transient receptor potential channels as novel drug targets in respiratory diseases. *Curr Opin Investig Drugs*, 11(5), 535-542.
- Navari, R. M. (2007). Fosaprepitant (MK-0517): a neurokinin-1 receptor antagonist for the prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting. *Expert Opin Investig Drugs*, 16(12), 1977-1985. doi: 10.1517/13543784.16.12.1977
- Navarro, V. M., Bosch, M. A., Leon, S., Simavli, S., True, C., Pinilla, L., . . . Kaiser, U. B. (2015). The integrated hypothalamic tachykinin-kisspeptin system as a central coordinator for reproduction. *Endocrinology*, 156(2), 627-637. doi: 10.1210/en.2014-1651
- Nawa, H., Doteuchi, M., Igano, K., Inouye, K., & Nakanishi, S. (1984). Substance K: a novel mammalian tachykinin that differs from substance P in its pharmacological profile. *Life Sci*, 34(12), 1153-1160.
- Nawa, H., Hirose, T., Takashima, H., Inayama, S., & Nakanishi, S. (1983). Nucleotide sequences of cloned cDNAs for two types of bovine brain substance P precursor. *Nature*, 306(5938), 32-36.
- Newlands, E. S., Paradinas, F. J., & Fisher, R. A. (1999). Recent advances in gestational trophoblastic disease. *Hematol Oncol Clin North Am*, 13(1), 225-244, x.
- Ngan, H. Y., Bender, H., Benedet, J. L., Jones, H., Montrucchi, G. C., Pecorelli, S., & Oncology, F. C. o. G. (2003). Gestational trophoblastic neoplasia, FIGO 2000 staging and classification. *Int J Gynaecol Obstet*, 83 Suppl 1, 175-177.

- Ngan, H. Y., Kohorn, E. I., Cole, L. A., Kurman, R. J., Kim, S. J., Lurain, J. R., . . . Soper, J. T. (2012). Trophoblastic disease. *Int J Gynaecol Obstet*, 119 Suppl 2, S130-136. doi: 10.1016/S0020-7292(12)60026-5
- Nilsson, J., von Euler, A. M., & Dalsgaard, C. J. (1985). Stimulation of connective tissue cell growth by substance P and substance K. *Nature*, 315(6014), 61-63.
- Nishida, T., Inui, M., & Nomizu, M. (2015). Peptide therapies for ocular surface disturbances based on fibronectin-integrin interactions. *Prog Retin Eye Res*, 47, 38-63. doi: 10.1016/j.preteyeres.2015.01.004
- O'Connell, P. J., Pingle, S. C., & Ahern, G. P. (2005). Dendritic cells do not transduce inflammatory stimuli via the capsaicin receptor TRPV1. *FEBS Lett*, 579(23), 5135-5139. doi: 10.1016/j.febslet.2005.08.023
- O'Connor, T. M., O'Connell, J., O'Brien, D. I., Goode, T., Bredin, C. P., & Shanahan, F. (2004). The role of substance P in inflammatory disease. *J Cell Physiol*, 201(2), 167-180. doi: 10.1002/jcp.20061
- O'Connor, W. T., Tanganelli, S., Ungerstedt, U., & Fuxe, K. (1992). The effects of neurotensin on GABA and acetylcholine release in the dorsal striatum of the rat: an in vivo microdialysis study. *Brain Res*, 573(2), 209-216.
- Okada, T., & Palczewski, K. (2001). Crystal structure of rhodopsin: implications for vision and beyond. *Curr Opin Struct Biol*, 11(4), 420-426.
- Okaya, T., Holthaus, R., Kato, A., & Lentsch, A. B. (2004). Involvement of the neuropeptide substance P in lung inflammation induced by hepatic ischemia/reperfusion. *Inflamm Res*, 53(6), 257-261. doi: 10.1007/s00011-004-1256-2
- Ortega, H. H., Salvetti, N. R., Baravalle, C., Lorente, J. A., & Mira, G. A. (2006). Oestradiol induced inhibition of neuroendocrine marker expression in Leydig cells of adult rats. *Reprod Domest Anim*, 41(3), 204-209. doi: 10.1111/j.1439-0531.2006.00669.x
- Otsuka, M., & Yoshioka, K. (1993). Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. *Physiol Rev*, 73(2), 229-308.
- Page, N. M. (2005). New challenges in the study of the mammalian tachykinins. *Peptides*, 26(8), 1356-1368. doi: 10.1016/j.peptides.2005.03.030
- Page, N. M. (2006). Characterization of the gene structures, precursor processing and pharmacology of the endokinin peptides. *Vascul Pharmacol*, 45(4), 200-208. doi: 10.1016/j.vph.2005.08.028
- Page, N. M. (2010). Neurokinin B and pre-eclampsia: a decade of discovery. *Reprod Biol Endocrinol*, 8, 4. doi: 10.1186/1477-7827-8-4
- Page, N. M., Bell, N. J., Gardiner, S. M., Manyonda, I. T., Brayley, K. J., Strange, P. G., & Lowry, P. J. (2003). Characterization of the endokinins: human tachykinins with cardiovascular activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(10), 6245-6250. doi: 10.1073/pnas.0931458100
- Page, N. M., Dakour, J., & Morrish, D. W. (2006). Gene regulation of neurokinin B and its receptor NK3 in late pregnancy and pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod*, 12(7), 427-433. doi: 10.1093/molehr/gal025
- Page, N. M., & Lowry, P. J. (2000). Is 'pre-eclampsia' simply a response to the side effects of a placental tachykinin? *J Endocrinol*, 167(3), 355-361.
- Page, N. M., Woods, R. J., Gardiner, S. M., Lomthaisong, K., Gladwell, R. T., Butlin, D. J., . . . Lowry, P. J. (2000). Excessive placental secretion of neurokinin B during the third trimester causes pre-eclampsia. *Nature*, 405(6788), 797-800. doi: 10.1038/35015579

- Page, N. M., Woods, R. J., & Lowry, P. J. (2001). A regulatory role for neurokinin B in placental physiology and pre-eclampsia. *Regul Pept*, 98(3), 97-104.
- Palanche, T., Ilien, B., Zoffmann, S., Reck, M. P., Bucher, B., Edelstein, S. J., & Galzi, J. L. (2001). The neurokinin A receptor activates calcium and cAMP responses through distinct conformational states. *J Biol Chem*, 276(37), 34853-34861. doi: 10.1074/jbc.M104363200
- Palma, C., Bigioni, M., Irrissuto, C., Nardelli, F., Maggi, C. A., & Manzini, S. (2000). Anti-tumour activity of tachykinin NK1 receptor antagonists on human glioma U373 MG xenograft. *Br J Cancer*, 82(2), 480-487. doi: 10.1054/bjoc.1999.0946
- Parenti, C., Arico, G., Ronsisvalle, G., & Scoto, G. M. (2012). Supraspinal injection of Substance P attenuates allodynia and hyperalgesia in a rat model of inflammatory pain. *Peptides*, 34(2), 412-418. doi: 10.1016/j.peptides.2012.01.016
- Park, S. W., Yan, Y. P., Satriotomo, I., Vemuganti, R., & Dempsey, R. J. (2007). Substance P is a promoter of adult neural progenitor cell proliferation under normal and ischemic conditions. *J Neurosurg*, 107(3), 593-599. doi: 10.3171/JNS-07/09/0593
- Patacchini, R., Santicoli, P., Zagorodnyuk, V., Lazzeri, M., Turini, D., & Maggi, C. A. (1998). Excitatory motor and electrical effects produced by tachykinins in the human and guinea-pig isolated ureter and guinea-pig renal pelvis. *Br J Pharmacol*, 125(5), 987-996. doi: 10.1038/sj.bjp.0702147
- Patak, E., Pinto, F. M., Story, M. E., Pintado, C. O., Fleming, A., Page, N. M., . . . Candenias, M. L. (2005). Functional and molecular characterization of tachykinins and tachykinin receptors in the mouse uterus. *Biol Reprod*, 72(5), 1125-1133. doi: 10.1095/biolreprod.104.036814
- Patel, H. J., Ramkissoon, S. H., Patel, P. S., & Rameshwar, P. (2005). Transformation of breast cells by truncated neurokinin-1 receptor is secondary to activation by preprotachykinin-A peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(48), 17436-17441. doi: 10.1073/pnas.0506351102
- Pattillo, R. A., Sasaki, S., Katayama, K. P., Roesler, M., & Mattingly, R. F. (1981). Genesis of 46,XY hydatidiform mole. *Am J Obstet Gynecol*, 141(1), 104-105.
- Payan, D. G., Brewster, D. R., & Goetzl, E. J. (1983). Specific stimulation of human T lymphocytes by substance P. *J Immunol*, 131(4), 1613-1615.
- Pelayo, J. C., Poole, D. P., Steinhoff, M., Cottrell, G. S., & Bunnett, N. W. (2011). Endothelin-converting enzyme-1 regulates trafficking and signalling of the neurokinin 1 receptor in endosomes of myenteric neurones. *J Physiol*, 589(Pt 21), 5213-5230. doi: 10.1113/jphysiol.2011.214452
- Pennefather, J. N., Lecci, A., Candenias, M. L., Patak, E., Pinto, F. M., & Maggi, C. A. (2004). Tachykinins and tachykinin receptors: a growing family. *Life Sci*, 74(12), 1445-1463.
- Pennefather, J. N., Patak, E., Ziccone, S., Lilley, A., Pinto, F. M., Page, N. M., . . . Candenias, M. L. (2006). Regulation of the stimulant actions of neurokinin a and human hemokinin-1 on the human uterus: a comparison with histamine. *Biol Reprod*, 75(3), 334-341. doi: 10.1095/biolreprod.106.051508
- Pernow, B. (1983). Substance P. *Pharmacol Rev*, 35(2), 85-141.
- Pernow, B. (1985). Role of tachykinins in neurogenic inflammation. *J Immunol*, 135(2 Suppl), 812s-815s.
- Petraglia, F., Florio, P., Nappi, C., & Genazzani, A. R. (1996). Peptide signaling in human placenta and membranes: autocrine, paracrine, and endocrine mechanisms. *Endocr Rev*, 17(2), 156-186. doi: 10.1210/edrv-17-2-156

- Piedimonte, G., Bertrand, C., Geppetti, P., Snider, R. M., Desai, M. C., & Nadel, J. A. (1993). A new NK1 receptor antagonist (CP-99,994) prevents the increase in tracheal vascular permeability produced by hypertonic saline. *J Pharmacol Exp Ther*, 266(1), 270-273.
- Pintado, C. O., Pinto, F. M., Pennefather, J. N., Hidalgo, A., Baamonde, A., Sanchez, T., & Candenas, M. L. (2003). A role for tachykinins in female mouse and rat reproductive function. *Biol Reprod*, 69(3), 940-946. doi: 10.1095/biolreprod.103.017111
- Pinto, F. M., Ravina, C. G., Subiran, N., Cejudo-Roman, A., Fernandez-Sanchez, M., Irazusta, J., . . . Candenas, L. (2010). Autocrine regulation of human sperm motility by tachykinins. *Reprod Biol Endocrinol*, 8, 104. doi: 10.1186/1477-7827-8-104
- Plotnikov, A., Zehorai, E., Procaccia, S., & Seger, R. (2011). The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochim Biophys Acta*, 1813(9), 1619-1633. doi: 10.1016/j.bbamcr.2010.12.012
- Porcelli, M., Casu, M., Lai, A., Saba, G., Pinori, M., Cappelletti, S., & Mascagni, P. (1999). Cyclic pentapeptides of chiral sequence DLDDL as scaffold for antagonism of G-protein coupled receptors: synthesis, activity and conformational analysis by NMR and molecular dynamics of ITF 1565 a substance P inhibitor. *Biopolymers*, 50(2), 211-219. doi: 10.1002/(SICI)1097-0282(199908)50:2<211::AID-BIP10>3.0.CO;2-E
- Portal, P. (1685). La pratique des accouchemens, soutenue d'un grand nombre d'observations. In G. Martin (Ed.). Paris.
- Powell, D., Leeman, S., Tregear, G. W., Niall, H. D., & Potts, J. T., Jr. (1973). Radioimmunoassay for substance P. *Nat New Biol*, 241(112), 252-254.
- Pradhan Nabzdyk, L., Kuchibhotla, S., Guthrie, P., Chun, M., Auster, M. E., Nabzdyk, C., . . . Veves, A. (2013). Expression of neuropeptides and cytokines in a rabbit model of diabetic neuroischemic wound healing. *J Vasc Surg*, 58(3), 766-775 e712. doi: 10.1016/j.jvs.2012.11.095
- Prasannan-Nair, C., Reynolds, S. F., & Budden, G. (2006). Partial molar pregnancy with severe pre-eclampsia at 19 weeks' gestation. *J Obstet Gynaecol*, 26(8), 817. doi: 10.1080/01443610600987092
- Pugazhenth, S., Nesterova, A., Sable, C., Heidenreich, K. A., Boxer, L. M., Heasley, L. E., & Reusch, J. E. (2000). Akt/protein kinase B up-regulates Bcl-2 expression through cAMP-response element-binding protein. *J Biol Chem*, 275(15), 10761-10766.
- Puneet, P., Hegde, A., Ng, S. W., Lau, H. Y., Lu, J., Mochhala, S. M., & Bhatia, M. (2006). Preprotachykinin-A gene products are key mediators of lung injury in polymicrobial sepsis. *J Immunol*, 176(6), 3813-3820.
- Quartara, L., & Maggi, C. A. (1997). The tachykinin NK1 receptor. Part I: ligands and mechanisms of cellular activation. *Neuropeptides*, 31(6), 537-563.
- Radhakrishnan, V., & Henry, J. L. (1995). Electrophysiology of neuropeptides in the sensory spinal cord. *Prog Brain Res*, 104, 175-195.
- Rameshwar, P., Poddar, A., Zhu, G., & Gascon, P. (1997). Receptor induction regulates the synergistic effects of substance P with IL-1 and platelet-derived growth factor on the proliferation of bone marrow fibroblasts. *J Immunol*, 158(7), 3417-3424.
- Ramkissoon, S. H., Patel, P. S., Taborga, M., & Rameshwar, P. (2007). Nuclear factor-kappaB is central to the expression of truncated neurokinin-1 receptor in breast cancer: implication for breast cancer cell quiescence within bone marrow stroma. *Cancer Res*, 67(4), 1653-1659. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3813

- Ramón y Cajal, S. (1892). El nuevo concepto de la histología de los centros nerviosos. *Revista Ciencias Médicas*, 18, 457-476.
- Ramón y Cajal, S. (1899). *Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados*. Madrid: Moya.
- Ravina, C. G., Seda, M., Pinto, F. M., Orea, A., Fernandez-Sanchez, M., Pintado, C. O., & Candenias, M. L. (2007). A role for tachykinins in the regulation of human sperm motility. *Hum Reprod*, 22(6), 1617-1625. doi: 10.1093/humrep/dem069
- . *Real Decreto 1716/2011, de 18 de noviembre, por el que se establecen los requisitos básicos de autorización y funcionamiento de los biobancos con fines de investigación biomédica y del tratamiento de las muestras biológicas de origen humano, y se regula el funcionamiento y organización del Registro Nacional de Biobancos para investigación biomédica*. (2011). Boletín Oficial del Estado.
- Reed-Hagen, A. E., Tsuchiya, M., Shimada, K., Wentland, J. A., & Obach, R. S. (1999). Pharmacokinetics of ezlopitant, a novel non-peptidic neurokinin-1 receptor antagonist in preclinical species and metabolite kinetics of the pharmacologically active metabolites. *Biopharm Drug Dispos*, 20(9), 429-439.
- Reeve, J. G., & Bleehen, N. M. (1994). [D-Arg1, D-Phe5, D-Trp7,9, Leu11] substance P induces apoptosis in lung cancer cell lines in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, 199(3), 1313-1319. doi: 10.1006/bbrc.1994.1374
- Regoli, D., Boudon, A., & Fauchere, J. L. (1994). Receptors and antagonists for substance P and related peptides. *Pharmacol Rev*, 46(4), 551-599.
- Richfield, E. K., Vonsattel, J. P., MacDonald, M. E., Sun, Z., Deng, Y. P., & Reiner, A. (2002). Selective loss of striatal preprotachykinin neurons in a phenocopy of Huntington's disease. *Mov Disord*, 17(2), 327-332.
- Ries, S., Biederer, C., Woods, D., Shifman, O., Shirasawa, S., Sasazuki, T., . . . McCormick, F. (2000). Opposing effects of Ras on p53: transcriptional activation of mdm2 and induction of p19ARF. *Cell*, 103(2), 321-330.
- Rittner, H. L., Lux, C., Labuz, D., Mousa, S. A., Schafer, M., Stein, C., & Brack, A. (2007). Neurokinin-1 receptor antagonists inhibit the recruitment of opioid-containing leukocytes and impair peripheral antinociception. *Anesthesiology*, 107(6), 1009-1017. doi: 10.1097/01.anes.0000291454.90754.de
- Robin, C., Bollerot, K., Mendes, S., Haak, E., Crisan, M., Cerisoli, F., . . . Dzierzak, E. (2009). Human placenta is a potent hematopoietic niche containing hematopoietic stem and progenitor cells throughout development. *Cell Stem Cell*, 5(4), 385-395. doi: 10.1016/j.stem.2009.08.020
- Robinson, C. J., Johnson, D. D., Chang, E. Y., Armstrong, D. M., & Wang, W. (2006). Evaluation of placenta growth factor and soluble Fms-like tyrosine kinase 1 receptor levels in mild and severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 195(1), 255-259. doi: 10.1016/j.ajog.2005.12.049
- Robinson, P., Garza, A., Moore, J., Eckols, T. K., Parti, S., Balaji, V., . . . Tweardy, D. J. (2009). Substance P is required for the pathogenesis of EMCV infection in mice. *Int J Clin Exp Med*, 2(1), 76-86.
- Rogers, D. F. (2001). Motor control of airway goblet cells and glands. *Respir Physiol*, 125(1-2), 129-144.
- Roninson, I. B. (2002). Oncogenic functions of tumour suppressor p21(Waf1/Cip1/Sdi1): association with cell senescence and tumour-promoting activities of stromal fibroblasts. *Cancer Lett*, 179(1), 1-14.

- Ronnett, B. M., DeScipio, C., & Murphy, K. M. (2011). Hydatidiform moles: ancillary techniques to refine diagnosis. *Int J Gynecol Pathol*, 30(2), 101-116. doi: 10.1097/PGP.0b013e3181f4de77
- Roosterman, D., Cottrell, G. S., Padilla, B. E., Muller, L., Eckman, C. B., Bunnett, N. W., & Steinhoff, M. (2007). Endothelin-converting enzyme 1 degrades neuropeptides in endosomes to control receptor recycling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(28), 11838-11843. doi: 10.1073/pnas.0701910104
- Roosterman, D., Cottrell, G. S., Schmidlin, F., Steinhoff, M., & Bunnett, N. W. (2004). Recycling and resensitization of the neurokinin 1 receptor. Influence of agonist concentration and Rab GTPases. *J Biol Chem*, 279(29), 30670-30679. doi: 10.1074/jbc.M402479200
- Rosler, N., Wichart, I., & Jellinger, K. A. (2001). Clinical significance of neurobiochemical profiles in the lumbar cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. *J Neural Transm*, 108(2), 231-246.
- Rosso, M., Munoz, M., & Berger, M. (2012). The role of neurokinin-1 receptor in the microenvironment of inflammation and cancer. *ScientificWorldJournal*, 2012, 381434. doi: 10.1100/2012/381434
- Rosso, M., Robles-Frias, M. J., Covenas, R., Salinas-Martin, M. V., & Munoz, M. (2008). The NK-1 receptor is expressed in human primary gastric and colon adenocarcinomas and is involved in the antitumor action of L-733,060 and the mitogenic action of substance P on human gastrointestinal cancer cell lines. *Tumour Biol*, 29(4), 245-254. doi: 10.1159/000152942
- Ruff, M. R., Wahl, S. M., & Pert, C. B. (1985). Substance P receptor-mediated chemotaxis of human monocytes. *Peptides*, 6 Suppl 2, 107-111.
- Rupniak, N. M., Carlson, E. C., Harrison, T., Oates, B., Seward, E., Owen, S., . . . Wheeldon, A. (2000). Pharmacological blockade or genetic deletion of substance P (NK(1)) receptors attenuates neonatal vocalisation in guinea-pigs and mice. *Neuropharmacology*, 39(8), 1413-1421.
- Sadler, T. W. (2012). *Langman. Embriología médica* (12 ed.). Philadelphia PA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Sakurada, S., Orito, T., Sakurada, C., Sato, T., Hayashi, T., Mobarakeh, J. I., . . . Sakurada, T. (2002). Possible involvement of tachykinin NK(1) and NMDA receptors in histamine-induced hyperalgesia in mice. *Eur J Pharmacol*, 434(1-2), 29-34.
- Sakurada, T., Manome, Y., Tan-No, K., Sakurada, S., Kisara, K., Ohba, M., & Terenius, L. (1992). A selective and extremely potent antagonist of the neurokinin-1 receptor. *Brain Res*, 593(2), 319-322.
- Sakurada, T., Yogo, H., Manome, Y., Tan-No, K., Sakurada, S., Yamada, A., . . . Ohba, M. (1994). Pharmacological characterisation of NK1 receptor antagonist, [D-Trp7]sendide, on behaviour elicited by substance P in the mouse. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 350(4), 387-392.
- Santini, D., Vincenzi, B., Guida, F. M., Imperatori, M., Schiavon, G., Venditti, O., . . . Tonini, G. (2012). Aprepitant for management of severe pruritus related to biological cancer treatments: a pilot study. *Lancet Oncol*, 13(10), 1020-1024. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70373-X
- Sastry, B. V., Tayeb, O. S., Barnwell, S. L., Janson, V. E., & Owens, L. K. (1981). Peptides from human placenta: methionine enkephalin and substance P. *Placenta Suppl*, 3, 327-337.

- Satake, H., & Kawada, T. (2006). Overview of the primary structure, tissue-distribution, and functions of tachykinins and their receptors. *Curr Drug Targets*, 7(8), 963-974.
- Schaaps, J. P., & Hustin, J. (1988). In Vivo Aspect of the Maternal — Trophoblastic Border during the First Trimester of Gestation. In P. Kaufmann & R. Miller (Eds.), *Placental Vascularization and Blood Flow* (Vol. 3, pp. 39-48): Springer US.
- Schalling, M., Dagerlind, A., Brene, S., Petterson, R., Kvist, S., Brownstein, M., . . . et al. (1987). Localization of mRNA for phenylethanolamine N-methyltransferase (PNMT) using in situ hybridization. *Acta Physiol Scand*, 131(4), 631-632. doi: 10.1111/j.1748-1716.1987.tb08288.x
- Schlafke, S., & Enders, A. C. (1975). Cellular basis of interaction between trophoblast and uterus at implantation. *Biol Reprod*, 12(1), 41-65.
- Schmidlin, F., Dery, O., DeFea, K. O., Slice, L., Patierno, S., Sternini, C., . . . Bunnett, N. W. (2001). Dynamin and Rab5a-dependent trafficking and signaling of the neurokinin 1 receptor. *J Biol Chem*, 276(27), 25427-25437. doi: 10.1074/jbc.M101688200
- Schneider, M. R., & Wolf, E. (2008). The epidermal growth factor receptor and its ligands in female reproduction: insights from rodent models. *Cytokine Growth Factor Rev*, 19(2), 173-181. doi: 10.1016/j.cytogfr.2008.01.003
- Schratzberger, P., Reinisch, N., Proding, W. M., Kahler, C. M., Sitte, B. A., Bellmann, R., . . . Wiedermann, C. J. (1997). Differential chemotactic activities of sensory neuropeptides for human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol*, 158(8), 3895-3901.
- Schwartz, J. P., & Costa, E. (1986). Hybridization approaches to the study of neuropeptides. *Annu Rev Neurosci*, 9, 277-304. doi: 10.1146/annurev.ne.09.030186.001425
- Schwartz, L., Spitsin, S. V., Meshki, J., Tuluc, F., Douglas, S. D., & Wolfe, J. H. (2013). Substance P enhances HIV-1 infection in human fetal brain cell cultures expressing full-length neurokinin-1 receptor. *J Neurovirol*, 19(3), 219-227. doi: 10.1007/s13365-013-0166-x
- Schwyzer, R. (1987). Membrane-assisted molecular mechanism of neurokinin receptor subtype selection. *EMBO J*, 6(8), 2255-2259.
- Sebire, N. J. (2010). Histopathological diagnosis of hydatidiform mole: contemporary features and clinical implications. *Fetal Pediatr Pathol*, 29(1), 1-16. doi: 10.3109/15513810903266138
- Seckl, M. J., Higgins, T., & Rozengurt, E. (1996). [D-Arg1,D-Trp5,7,9,Leu11]Substance P coordinately and reversibly inhibits bombesin- and vasopressin-induced signal transduction pathways in Swiss 3T3 cells. *J Biol Chem*, 271(46), 29453-29460.
- Seckl, M. J., Higgins, T., Widmer, F., & Rozengurt, E. (1997). [D-Arg1,D-Trp5,7,9,Leu11]substance P: a novel potent inhibitor of signal transduction and growth in vitro and in vivo in small cell lung cancer cells. *Cancer Res*, 57(1), 51-54.
- Seckl, M. J., Sebire, N. J., & Berkowitz, R. S. (2010). Gestational trophoblastic disease. *Lancet*, 376(9742), 717-729. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60280-2
- Seckl, M. J., Sebire, N. J., Fisher, R. A., Golfier, F., Massuger, L., Sessa, C., & Group, E. G. W. (2013). Gestational trophoblastic disease: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 24 Suppl 6, vi39-50. doi: 10.1093/annonc/mdt345
- Seidah, N. G., & Chretien, M. (1999). Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides. *Brain Res*, 848(1-2), 45-62.

- Severini, C., Improta, G., Falconieri-Erspamer, G., Salvadori, S., & Erspamer, V. (2002). The tachykinin peptide family. *Pharmacol Rev*, 54(2), 285-322.
- Shaik-Dasthagirisahab, Y. B., Varvara, G., Murmura, G., Saggini, A., Potalivo, G., Caraffa, A., . . . Pandolfi, F. (2013). Vascular endothelial growth factor (VEGF), mast cells and inflammation. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 26(2), 327-335.
- Sheperd, G. M. (1991). *Foundations of the neuron doctrine*. New York: Oxford University Press.
- Sherrington, C. S. (1906). *The integrative action of the nervous system*. New York: Scribner.
- Shih, I.-M. (2007). Gestational trophoblastic neoplasia—pathogenesis and potential therapeutic targets. *The Lancet Oncology*, 8(7), 642-650. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(07\)70204-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(07)70204-8)
- Shimizu, T., Miwa, W., Nakamori, S., Ishikawa, O., Konishi, Y., & Sekiya, T. (1996). Absence of a mutation of the p21/WAF1 gene in human lung and pancreatic cancers. *Jpn J Cancer Res*, 87(3), 275-278.
- Shimizu, Y., Matsuyama, H., Shiina, T., Takewaki, T., & Furness, J. B. (2008). Tachykinins and their functions in the gastrointestinal tract. *Cell Mol Life Sci*, 65(2), 295-311. doi: 10.1007/s00018-007-7148-1
- Singh, D., Joshi, D. D., Hameed, M., Qian, J., Gascon, P., Maloof, P. B., . . . Rameshwar, P. (2000). Increased expression of preprotachykinin-I and neurokinin receptors in human breast cancer cells: implications for bone marrow metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(1), 388-393.
- Singh, M., Kindelberger, D., Nagymanyoki, Z., Ng, S. W., Quick, C. M., Yamamoto, H., . . . Berkowitz, R. S. (2012). Vascular endothelial growth factors and their receptors and regulators in gestational trophoblastic diseases and normal placenta. *J Reprod Med*, 57(5-6), 197-203.
- Skrabanek, P., Cannon, D., Dempsey, J., Kirrane, J., Neligan, M., & Powell, D. (1979). Substance P in medullary carcinoma of the thyroid. *Experientia*, 35(9), 1259-1260.
- Sloniecka, M., Le Roux, S., Boman, P., Bystrom, B., Zhou, Q., & Danielson, P. (2015). Expression Profiles of Neuropeptides, Neurotransmitters, and Their Receptors in Human Keratocytes In Vitro and In Situ. *PLoS One*, 10(7), e0134157. doi: 10.1371/journal.pone.0134157
- Smelli, W. (1764). A collection of cases and observations in midwifery. In D. Wilson (Ed.), (Tercera ed., Vol. II). Londres.
- Smyth, C. M., Akasheh, N., Woods, S., Kay, E., Morgan, R. K., Thornton, M. A., . . . Costello, R. W. (2013). Activated eosinophils in association with enteric nerves in inflammatory bowel disease. *PLoS One*, 8(5), e64216. doi: 10.1371/journal.pone.0064216
- Snider, R. M., Constantine, J. W., Lowe, J. A., 3rd, Longo, K. P., Lebel, W. S., Woody, H. A., . . . et al. (1991). A potent nonpeptide antagonist of the substance P (NK1) receptor. *Science*, 251(4992), 435-437.
- Société de Médecins. (1827). Archives générales de médecine. 5^o año. In B. a. Migneret (Ed.), (Vol. 14). París.
- Somogyi, P., Priestley, J. V., Cuello, A. C., Smith, A. D., & Bolam, J. P. (1982). Synaptic connections of substance P-immunoreactive nerve terminals in the substantia nigra of the rat. A correlated light- and electron-microscopic study. *Cell Tissue Res*, 223(3), 469-486.

- Soto-Wright, V., Bernstein, M., Goldstein, D. P., & Berkowitz, R. S. (1995). The changing clinical presentation of complete molar pregnancy. *Obstet Gynecol*, 86(5), 775-779. doi: 10.1016/0029-7844(95)00268-v
- Steigrad, S. J. (2003). Epidemiology of gestational trophoblastic diseases. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 17(6), 837-847.
- Steinhoff, M. S., von Mentzer, B., Geppetti, P., Pothoulakis, C., & Bunnett, N. W. (2014). Tachykinins and their receptors: contributions to physiological control and the mechanisms of disease. *Physiol Rev*, 94(1), 265-301. doi: 10.1152/physrev.00031.2013
- Stenkamp, R. E., Filipek, S., Driessen, C. A., Teller, D. C., & Palczewski, K. (2002). Crystal structure of rhodopsin: a template for cone visual pigments and other G protein-coupled receptors. *Biochim Biophys Acta*, 1565(2), 168-182.
- Sternini, C. (1991). Tachykinin and calcitonin gene-related peptide immunoreactivities and mRNAs in the mammalian enteric nervous system and sensory ganglia. *Adv Exp Med Biol*, 298, 39-51.
- Strader, C. D., Fong, T. M., Tota, M. R., Underwood, D., & Dixon, R. A. (1994). Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annu Rev Biochem*, 63, 101-132. doi: 10.1146/annurev.bi.63.070194.000533
- Strand, F. L. (1999). *Neuropeptides: Regulators of Physiological Processes*: MIT Press.
- Suárez Figaredo, E. (2012). Jardín de flores curiosas. Antonio de Torquemada. *Lemir*, 16, 605-834.
- Tatemoto, K., Lundberg, J. M., Jornvall, H., & Mutt, V. (1985). Neuropeptide K: isolation, structure and biological activities of a novel brain tachykinin. *Biochem Biophys Res Commun*, 128(2), 947-953.
- Tattersall, F. D., Rycroft, W., Cumberbatch, M., Mason, G., Tye, S., Williamson, D. J., . . . Hargreaves, R. J. (2000). The novel NK1 receptor antagonist MK-0869 (L-754,030) and its water soluble phosphoryl prodrug, L-758,298, inhibit acute and delayed cisplatin-induced emesis in ferrets. *Neuropharmacology*, 39(4), 652-663.
- Theoharides, T. C., Zhang, B., Kempuraj, D., Tagen, M., Vasiadi, M., Angelidou, A., . . . Conti, P. (2010). IL-33 augments substance P-induced VEGF secretion from human mast cells and is increased in psoriatic skin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(9), 4448-4453. doi: 10.1073/pnas.1000803107
- Thorsell, A., Schank, J. R., Singley, E., Hunt, S. P., & Heilig, M. (2010). Neurokinin-1 receptors (NK1R:s), alcohol consumption, and alcohol reward in mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 209(1), 103-111. doi: 10.1007/s00213-010-1775-1
- Thureson-Klein, A. K., & Klein, R. L. (1990). Exocytosis from neuronal large dense-cored vesicles. *Int Rev Cytol*, 121, 67-126.
- Tian, Y., Yang, G., Zhang, X., Shen, W., Dong, J., & Xu, Z. (2014). Effects of substance P on growth of fibroblast-like cells derived from bile duct: an in vitro cell culture study. *Chin Med J (Engl)*, 127(17), 3121-3126.
- Topaloglu, A. K., & Semple, R. K. (2011). Neurokinin B signalling in the human reproductive axis. *Mol Cell Endocrinol*, 346(1-2), 57-64. doi: 10.1016/j.mce.2011.07.014
- Tortora, G. J., & Derrickson, B. (2013). *Principios de anatomía y fisiología / Principles of Anatomy and Physiology: Incluye Sitio Web*: Editorial Medica Panamericana Sa de.
- Tregear, G. W., Niall, H. D., Potts, J. T., Jr., Leeman, S. E., & Chang, M. M. (1971). Synthesis of substance P. *Nat New Biol*, 232(29), 87-89.

- Tuncer, Z. S., Vegh, G. L., Fulop, V., Genest, D. R., Mok, S. C., & Berkowitz, R. S. (2000). Expression of epidermal growth factor receptor-related family products in gestational trophoblastic diseases and normal placenta and its relationship with development of postmolar tumor. *Gynecol Oncol*, 77(3), 389-393. doi: 10.1006/gyno.2000.5777
- Twardy, B. S., Channappanavar, R., & Suvas, S. (2011). Substance P in the corneal stroma regulates the severity of herpetic stromal keratitis lesions. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52(12), 8604-8613. doi: 10.1167/iovs.11-8089
- Urso, L., Calabrese, F., Favaretto, A., Conte, P., & Pasello, G. (2015). Critical review about MDM2 in cancer: Possible role in malignant mesothelioma and implications for treatment. *Crit Rev Oncol Hematol*. doi: 10.1016/j.critrevonc.2015.08.019
- US, V. E., & Gaddum, J. H. (1931). An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *J Physiol*, 72(1), 74-87.
- Valentin-Hansen, L., Park, M., Huber, T., Grunbeck, A., Naganathan, S., Schwartz, T. W., & Sakmar, T. P. (2014). Mapping substance P binding sites on the neurokinin-1 receptor using genetic incorporation of a photoreactive amino acid. *J Biol Chem*, 289(26), 18045-18054. doi: 10.1074/jbc.M113.527085
- van Giersbergen, P. L., Shatzer, S. A., Burcher, E., & Buck, S. H. (1992). Comparison of the effects of neuropeptide K and neuropeptide gamma with neurokinin A at NK2 receptors in the hamster urinary bladder. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 345(1), 51-56.
- Vassilakos, P., Riotton, G., & Kajii, T. (1977). Hydatidiform mole: two entities. A morphologic and cytogenetic study with some clinical consideration. *Am J Obstet Gynecol*, 127(2), 167-170.
- Verhage, M., McMahon, H. T., Ghijsen, W. E., Boomsma, F., Scholten, G., Wiegant, V. M., & Nicholls, D. G. (1991). Differential release of amino acids, neuropeptides, and catecholamines from isolated nerve terminals. *Neuron*, 6(4), 517-524.
- Vilisaar, J., Kawabe, K., Braitch, M., Aram, J., Furtun, Y., Fahey, A. J., . . . Constantinescu, C. S. (2015). Reciprocal Regulation of Substance P and IL-12/IL-23 and the Associated Cytokines, IFNgamma/IL-17: A Perspective on the Relevance of This Interaction to Multiple Sclerosis. *J Neuroimmune Pharmacol*, 10(3), 457-467. doi: 10.1007/s11481-015-9589-x
- Villar, A. V., Goni, F. M., Alonso, A., Jones, D. R., Leon, Y., & Varela-Nieto, I. (1998). Phospholipase cleavage of glycosylphosphatidylinositol reconstituted in liposomal membranes. *FEBS Lett*, 432(3), 150-154.
- Vink, R., Donkin, J. J., Cruz, M. I., Nimmo, A. J., & Cernak, I. (2004). A substance P antagonist increases brain intracellular free magnesium concentration after diffuse traumatic brain injury in rats. *J Am Coll Nutr*, 23(5), 538S-540S.
- Vishalakumar, S., Patel, H., Moharita, A. L., Harrison, J. S., & Rameshwar, P. (2006). The anti-proliferative effect of neurokinin-A on hematopoietic progenitor cells is partly mediated by p53 activating the 5' flanking region of neurokinin-2 receptor. *Cell Signal*, 18(4), 422-432. doi: 10.1016/j.cellsig.2005.05.002
- Walczak-Drzewiecka, A., Ratajewski, M., Wagner, W., & Dastych, J. (2008). HIF-1alpha is up-regulated in activated mast cells by a process that involves calcineurin and NFAT. *J Immunol*, 181(3), 1665-1672.
- Wang, H., Zheng, X. F., Zhang, X., Li, Z., Shen, C., Zhu, J. F., . . . Chen, X. D. (2014). Increasing substance P levels in serum and synovial tissues from patients with

- developmental dysplasia of the hip (DDH). *BMC Musculoskelet Disord*, 15, 92. doi: 10.1186/1471-2474-15-92
- Wang, X., Douglas, S. D., Peng, J. S., Zhou, D. J., Wan, Q., & Ho, W. Z. (2006). An in vitro model of morphine withdrawal manifests the enhancing effect on human immunodeficiency virus infection of human T lymphocytes through the induction of substance P. *Am J Pathol*, 169(5), 1663-1670. doi: 10.2353/ajpath.2006.060358
- Wang, Y., Wang, M., Yin, S., Jang, R., Wang, J., Xue, Z., & Xu, T. (2015). NeuroPep: a comprehensive resource of neuropeptides. *Database (Oxford)*, 2015, bav038. doi: 10.1093/database/bav038
- Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science*, 123(3191), 309-314.
- Weinstock, J. V. (2004). The role of substance P, hemokinin and their receptor in governing mucosal inflammation and granulomatous responses. *Front Biosci*, 9, 1936-1943.
- Weinstock, J. V., Blum, A., Walder, J., & Walder, R. (1988). Eosinophils from granulomas in murine schistosomiasis mansoni produce substance P. *J Immunol*, 141(3), 961-966.
- Welsch, U., & Sobotta, J. (2010). *Histología*. Madrid: Ed. Médica Panamericana.
- Wetzka, B., Clark, D. E., Charnock-Jones, D. S., Zahradnik, H. P., & Smith, S. K. (1997). Isolation of macrophages (Hofbauer cells) from human term placenta and their prostaglandin E2 and thromboxane production. *Hum Reprod*, 12(4), 847-852.
- Williams, B. J., Curtis, N. R., McKnight, A. T., Maguire, J. J., Young, S. C., Veber, D. F., & Baker, R. (1993). Cyclic peptides as selective tachykinin antagonists. *J Med Chem*, 36(1), 2-10.
- Wimalasundera, R. C., Thom, S. A., Regan, L., & Hughes, A. D. (2005). Effects of vasoactive agents on intracellular calcium and force in myometrial and subcutaneous resistance arteries isolated from preeclamptic, pregnant, and nonpregnant woman. *Am J Obstet Gynecol*, 192(2), 625-632. doi: 10.1016/j.ajog.2004.07.040
- Wislocki, G. B., & Streeter, G. L. (1938). On the placentation in the macaque (*Macaca mulatta*) from the time of implantation until formation of the definitive placenta. *Carnegie Contrib Embryol*, 27, 1-65.
- Woll, P. J., & Rozengurt, E. (1988). [D-Arg1,D-Phe5,D-Trp7,9,Leu11]substance P, a potent bombesin antagonist in murine Swiss 3T3 cells, inhibits the growth of human small cell lung cancer cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(6), 1859-1863.
- Wong, S. Y., Ngan, H. Y., Chan, C. C., & Cheung, A. N. (1999). Apoptosis in gestational trophoblastic disease is correlated with clinical outcome and Bcl-2 expression but not Bax expression. *Mod Pathol*, 12(11), 1025-1033.
- World Medical, A. (2013). World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA*, 310(20), 2191-2194. doi: 10.1001/jama.2013.281053
- Yamaguchi, K., Kugimiya, T., & Miyazaki, T. (2005). Substance P receptor in U373 MG human astrocytoma cells activates mitogen-activated protein kinases ERK1/2 through Src. *Brain Tumor Pathol*, 22(1), 1-8. doi: 10.1007/s10014-005-0178-1
- Yamaguchi, K., Richardson, M. D., Bigner, D. D., & Kwatra, M. M. (2005). Signal transduction through substance P receptor in human glioblastoma cells: roles for Src and PKCdelta. *Cancer Chemother Pharmacol*, 56(6), 585-593. doi: 10.1007/s00280-005-1030-3

- Yang, M., Lei, Z. M., & Rao Ch, V. (2003). The central role of human chorionic gonadotropin in the formation of human placental syncytium. *Endocrinology*, 144(3), 1108-1120. doi: 10.1210/en.2002-220922
- Yaraee, R., Ebtekar, M., Ahmadiani, A., Sabahi, F., & Ghazanfari, T. (2007). The effect of substance P on nitric oxide production by HSV-1 infected macrophages. *Int Immunopharmacol*, 7(2), 135-139. doi: 10.1016/j.intimp.2006.09.001
- Yver, M., Carles, D., Bloch, B., Bioulac-Sage, P., & Martin Negrier, M. L. (2004). Determination of DNA ploidy by fluorescence in situ hybridization (FISH) in hydatidiform moles: evaluation of FISH on isolated nuclei. *Hum Pathol*, 35(6), 752-758.
- Zachrisson, O., Lindefors, N., & Brene, S. (1998). A tachykinin NK1 receptor antagonist, CP-122,721-1, attenuates kainic acid-induced seizure activity. *Brain Res Mol Brain Res*, 60(2), 291-295.
- Zhang, M. M., Ji, W., Pei, L. Y., Wang, W., Chen, T., Wang, W., . . . Li, Y. Q. (2013). Acute colitis induces neurokinin 1 receptor internalization in the rat lumbosacral spinal cord. *PLoS One*, 8(3), e59234. doi: 10.1371/journal.pone.0059234
- Zhang, Y., Lu, L., Furlonger, C., Wu, G. E., & Paige, C. J. (2000). Hemokinin is a hematopoietic-specific tachykinin that regulates B lymphopoiesis. *Nat Immunol*, 1(5), 392-397. doi: 10.1038/80826
- Zhao, M., Yin, Y., Guo, F., Wang, J., Wang, K., & Chen, Q. (2013). Placental expression of VEGF is increased in pregnancies with hydatidiform mole: possible association with developing very early onset preeclampsia. *Early Hum Dev*, 89(8), 583-588. doi: 10.1016/j.earlhumdev.2013.02.008
- Ziche, M., Morbidelli, L., Pacini, M., Dolara, P., & Maggi, C. A. (1990). NK1-receptors mediate the proliferative response of human fibroblasts to tachykinins. *Br J Pharmacol*, 100(1), 11-14.
- Ziche, M., Morbidelli, L., Pacini, M., Geppetti, P., Alessandri, G., & Maggi, C. A. (1990). Substance P stimulates neovascularization in vivo and proliferation of cultured endothelial cells. *Microvasc Res*, 40(2), 264-278.
- Zimmer, G., Rohn, M., McGregor, G. P., Schemann, M., Conzelmann, K. K., & Herrler, G. (2003). Virokinin, a bioactive peptide of the tachykinin family, is released from the fusion protein of bovine respiratory syncytial virus. *J Biol Chem*, 278(47), 46854-46861. doi: 10.1074/jbc.M306949200